

30° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia

Catania, 6-9 Ottobre 2002



Riassunti

NOVITÀ IN TEMA DI LEISHMANIOSI VISCERALE ZOONOTICA IN ITALIA

Luigi Gradoni

Laboratorio di Parassitologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La leishmaniosi viscerale zoonotica (LV) è una grave infezione protozoaria a diffusione globale causata da *Leishmania infantum*, che ha il cane come serbatoio naturale e flebotomi del sottogenere *Phlebotomus (Larrousius)* come vettori nell'area Mediterranea.

Trends epidemiologici – In Italia, la LV umana è una malattia riemergente (40 casi nel 1990, circa 200 nel 2001), nonostante che l'incidenza delle co-infezioni in soggetti HIV-positivi sia diminuita grazie all'uso di terapie HAART. L'infezione nel cane è sempre più diffusa in tutto il centro-sud, mentre nuovi focolai stabili sono stati registrati in diverse regioni del nord. Per contrastare questi trends, negli ultimi anni si sono intensificate le ricerche per il controllo della malattia.

Terapia della LV umana – La riduzione della mortalità, che si raggiunge con una diagnosi rapida ed una terapia efficace e sicura, costituisce il controllo primario di una malattia grave come la LV. In Italia, nell'arco di un decennio i sali dell'antimonio pentavalente (100% dei trattamenti nel 1990) sono stati praticamente sostituiti da formulazioni lipidiche dell'amfotericina B (97% dei trattamenti nel 2001), farmaci molto efficaci e privi di effetti collaterali. Oltre ad azzerare la letalità antimonio-correlata (stimata in un 7% tra pazienti adulti HIV-negativi), l'utilizzo di questi prodotti ha contrastato il fenomeno sempre più diffuso dell'antimonio-resistenza causata dal massiccio uso di antimoniali nella terapia della leishmaniosi canina.

Controllo della trasmissione – L'interruzione del ciclo cane-flebotomo-cane/uomo è stata oggetto di recenti studi di campo sull'uso di collari a lento rilascio di deltametrina. In condizioni sperimentali, questo prodotto presenta sia azione anti-feeding che insetticida nei confronti dei flebotomi. L'uso massivo di collari nei cani di proprietà di un paese vesuviano nel corso di due stagioni di trasmissione, ha prodotto l'86% di riduzione di incidenza di leishmaniosi canina rispetto a quella riscontrata in paesi limitrofi di controllo. Durante lo stesso periodo, inoltre, non si sono verificati casi di malattia umana nel paese di intervento. Questa riduzione significativa risultava derivata da una combinazione di protezione individuale (protezione di un cane sano dalla puntura infettante, circa il 50%) e protezione di massa (riduzione del numero di flebotomi sopravvissuti dopo la puntura su un cane infetto).

LOCHPROBLEMI DI RESISTENZE NEI GRAM-NEGATIVI

Gian Maria Rossolini*, Alessandro Bartoloni°, Franco Paradisi°

*Dipartimento di Biologia Molecolare - Sezione di Microbiologia, Università di Siena

° Dipartimento di Area Critica Medico Chirurgica - Clinica Malattie Infettive, Università di Firenze

E' universalmente condiviso che la diffusione delle chemioresistenze batteriche, che rappresenta uno dei più importanti problemi di salute pubblica a livello mondiale, sia una inevitabile conseguenza del massiccio impiego degli antibiotici in campo medico e veterinario. Su queste premesse si basano le raccomandazioni per un uso razionale e prudente degli antibiotici, considerato indispensabile per conservare più a lungo possibile l'efficacia di questi farmaci. Tuttavia molti aspetti nella complessa interazione tra antibiotici ed ecosistemi microbici restano ancora da chiarire. E' noto, ad esempio, che la restrizione nell'uso di certi farmaci non sempre si accompagna ad una rapida riduzione della prevalenza delle resistenze batteriche nei loro confronti.

In questo intervento saranno presi in considerazione alcuni aspetti del rapporto tra uso di antimicrobici e diffusione delle chemioresistenze nei batteri gram-negativi. In particolare, come spunto per una discussione sui fattori che possano influenzare la disseminazione di geni di resistenza, saranno riportati i risultati di uno studio che è stato recentemente effettuato sulla diffusione di chemioresistenze nel microbiota commensale (*Escherichia coli* fecali) della popolazione di comunità remote ed isolate di Indios Guarani in America Latina, in cui l'impiego di antibiotici è stato, fino ad oggi, trascurabile.

Sorprendentemente, nei soggetti studiati, è stata riscontrata una elevata prevalenza di resistenze nei confronti di alcuni farmaci quali tetraciclina (64%), β -lattamici (58%), cotrimossazolo (51%) e cloramfenicolo (42%), non riconducibile ad un significativo uso presente o passato di questi o altri farmaci in quella popolazione. I risultati di questo studio suggeriscono quindi che non sempre un'ampia diffusione di geni di resistenza nel microbiota commensale dell'intestino è direttamente correlata con un massiccio impiego di antibiotici. L'analisi dei fenotipi di resistenza degli isolati, e l'analisi molecolare dei loro determinanti di resistenza, ha permesso di formulare alcune ipotesi sui meccanismi che potrebbero stare alla base di questo fenomeno.

MALATTIA PARODONTALE E PATOLOGIE SISTEMICHE

Dott. Marco Artini, G. Blandino*

*Università di Roma "La Sapienza", Roma; *Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche, Università degli Studi di Catania, Catania*

La placca dentale batterica (un biofilm naturale in equilibrio con l'ecosistema del cavo orale) ha un ruolo di promozione nei confronti della malattia parodontale; le difese dell'ospite ne influenzano fortemente le forme cliniche e la progressione, e varie condizioni fisiologiche (gravidanza e menopausa), o patologiche (diabete, osteoporosi, sindrome di Sjogren, fumo, infezione da HSV) possono alterare tale equilibrio per la riduzione dei sistemi di controllo infettivo-infiammatorio sistemici e locali. Le stesse condizioni possono anche aggravare tutte le forme di parodontite preesistente.

Tra i fattori sopradescritti è certo il ruolo patogenetico di alcune condizioni, come nel caso della riduzione nel numero o nella funzione dei leucociti polimorfonucleati. Per altri fattori il ruolo è meno chiaro o deve essere dimostrato definitivamente un legame causale con la parodontite. Pertanto è comunque generalmente accettato che varie condizioni sono correlate ad un'aumentata prevalenza, incidenza o severità della gengivite e della parodontite.

Capovolgendo la prospettiva, è stato ipotizzato da tempo che la malattia parodontale possa avere un ruolo patogenetico in alcuni quadri morbosi. Tra questi l'aterosclerosi e le condizioni cliniche che da essa derivano (patologia cardiovascolare e neurovascolare), la polmonite da aspirazione, i parti prematuri ed alcune forme di anemia.

Tra le patologie sopracitate la malattia cardiovascolare viene ampiamente indagata e recenti dati epidemiologici hanno suggerito che la parodontite possa rappresentare per essa un importante fattore di rischio. Due modelli patogenetici, tra quelli proposti, suggeriscono una relazione tra parodontopatia ed evoluzione della placca aterosclerotica:

batteri provenienti dalle tasche parodontali possono invadere le cellule dello stroma della placca promuovendo l'infiammazione locale;

l'immissione in circolo di prodotti batterici (endotossine e lipopolisaccaridi) e citochine (IL6, IL8,...) provenienti dalla sede dell'infezione parodontale può stimolare la proliferazione e la persistenza dell'infiammazione. Anche la semplice masticazione svolgerebbe un ruolo di "spremitura" delle gengive colonizzate ed infiammate nel paziente parodontopatico.

L'approfondimento ulteriore delle relazioni esistenti tra parodontite e patologie sistemiche è fondamentale per la messa a punto di strategie preventive finalizzate a ridurre la loro prevalenza.

LE CELLULE DENDRITICHE NELLA PRESENTAZIONE DELL'ANTIGENE VIRALE: PROSPETTIVE VACCINALI

Filippo Belardelli.

Laboratorio di Virologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

Le cellule dendritiche (DC) sono cellule con funzioni specializzate per catturare l'antigene e presentarlo ai linfociti per dare inizio alla risposta immune contro agenti patogeni o cellule neoplastiche. I progressi recenti della ricerca sulla biologia delle DC hanno dimostrato che alcune citochine prodotte da cellule dell'immunità innata svolgono un ruolo importante nel modulare l'attività delle DC verso la generazione di risposte immuni protettive. Queste nuove conoscenze permettono oggi di delineare nuove prospettive vaccinali basate sull'utilizzo di citochine con attività sulle DC quali adiuvanti naturali di vaccini umani. In tale contesto, studi preclinici condotti in modelli animali hanno di recente indotto il nostro gruppo a disegnare un trial clinico basato sull'uso di interferone alfa (IFN- α) come adiuvante in strategie di vaccinazione contro il virus dell'epatite B. Di recente, le nuove conoscenze sulle DC hanno anche condotto all'avvio di sperimentazioni cliniche basate sull'utilizzo di DC quali adiuvanti cellulari di vaccini terapeutici. Questi studi sono stati prevalentemente condotti in pazienti oncologici, soprattutto nel caso di tumori per i quali sono stati identificati antigeni bersaglio della risposta immune, quali il melanoma e il carcinoma renale. Tuttavia, un crescente interesse è oggi anche concentrato sul possibile uso di DC come adiuvanti cellulari per lo sviluppo di vaccini terapeutici contro un'infezione virale, quali quelle da HIV-1, HPV, HCV e HBV. Diverse tecniche per la generazione di DC da precursori del sangue periferico sono state descritte. Il nostro gruppo ha recentemente descritto una nuova metodica per ottenere DC dotate di forte attività nel generare una risposta immune a partire da monociti isolati dal sangue periferico di soggetti sani. Questa metodica prevede il trattamento *in vitro* dei monociti per tempi brevi con IFN- α e GM-CSF. Risultati preclinici *in vitro* e *in vivo*, ottenuti in modelli di infezione con HIV-1 e EBV, suggeriscono che tali DC (IFN-DC) possano costituire forti adiuvanti cellulari per lo sviluppo di strategie di vaccinazione terapeutica contro infezioni virali. I risultati degli studi preclinici e le prospettive di applicazione clinica delle IFN-DC per lo sviluppo di vaccini terapeutici antivirali saranno presentati e discussi.

LE INFEZIONI DA EHRLICHIA NELL'UOMO.

Marina Cinco

Laboratorio Spirochete, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Trieste.

Una delle infezioni trasmesse da zecche per lo più appartenenti al genere *Ixodes* ed *Amblyomma* sia all'uomo che altri mammiferi è rappresentata dall'ehrlichiosi. L'ehrlichiosi umana di tipo monocitico (HME) e granulocitico (HGE) sono causate da procarioti che venivano classificati nell'ordine *Rickettsiales*; (tribù delle *Ehrlichieae*) in virtù del loro parassitismo endocellulare obbligato; a differenza di queste tuttavia le Ehrlichie si presentano confinate nelle vescicole endoplasmatiche di cellule leucocitarie. Nel 2001, sulla base della sequenziazione del gene rRNA 16S e derivatizzazione filogenetica, le Ehrlichie sono state incluse nel genere *Anaplasma* e suddivise in tre cladi: *Anaplasma*, *Neorickettsia* ed *Ehrlichia*. Le specie responsabili di ehrlichiosi umana sono *A. phagocytophila* (HGE), *E. chaffensis* (HME), *E. edwingii*, *Neorickettsia sennetsu*. Il decorso dell'ehrlichiosi umana è perlopiù subclinica e comunque aspecifica. Si osservano leucopenia, trombocitopenia, elevati livelli plasmatici di transaminasi epatiche. Nel caso della HME si sono verificati decessi, comunque in individui immunocompromessi. I casi di ehrlichiosi monocitica si riscontrano prevalentemente negli USA, ove è presente la zecca vettrice *Amblyomma americanum*. L'ehrlichiosi granulocitica, causata da *A. phagocytophila* è veicolata da *I. scapularis* (USA) e *Ixodes ricinus* (Eurasia) gli stessi vettori che trasmettono *Borrelia burgdorferi*. L'epidemiologia delle due infezioni risulta infatti sovrapponibile. Ben più di mille casi di ehrlichiosi granulocitica sono stati registrati negli USA; in Europa solo recentemente- negli anni 2000- i primi 12 casi sono stati individuati in Slovenia, cui sono seguite fino a cinquanta segnalazioni in Polonia, Svezia, Norvegia, Belgio, Spagna, Rep. Ceca ed infine, ad opera del nostro gruppo, anche in Italia. Vengono descritti i risultati di ricerche sulla presenza di *A. phagocytophila* nella nostra regione FVG operate dal nostro gruppo, sino all'individuazione dei primi due casi di ehrlichiosi umana nell'uomo.

L'aspecificità della sintomatologia clinica e la non ancora standardizzata diagnosi microbiologica rendono questa infezione "tick borne" di non facile individuazione, ma di rimarchevole importanza nella diagnosi differenziale verso altre patologie.

LA TERAPIA DELLE INFEZIONI INTRADDOMINALI: DI COSA ABBIAMO BISOGNO?

Silvano Esposito

Istituto di Malattie Infettive Seconda Università degli Studi di Napoli

Con il termine infezioni intraddominali taluni intendono ciascuna infezione a carico degli organi intraddominali (colecistite, appendicite, diverticolite, peritonite...), altri intendono invece esclusivamente le infezioni del peritoneo (peritoniti) eventualmente conseguenti ad una infezione primitiva localizzata in altre sedi e trasmessa per contiguità, tanto da utilizzare il termine peritonite ed infezione intraddominale come sinonimi. La peritonite può essere classificata come primaria se la contaminazione della cavità peritoneale avviene ad opera di batteri provenienti dalla via ematogena o linfatica, e secondaria se invece è determinata dalla perforazione di un tratto del gastro-intestino con fuoriuscita del suo contenuto contaminato.

La flora batterica del tratto gastrointestinale, che presenta notevoli diversità in termini sia di specie batteriche che di numero di microrganismi a seconda della sede considerata (stomaco, duodeno, ileo, colon), rende comunque ragione di una eziologia della peritonite secondaria sempre polimicrobica dove la flora batterica anaerobia rappresenta una quota prevalente. Per appendicite si intende un processo infiammatorio acuto a carico dell'appendice vermiforme la cui patogenesi è da ricercare nell'occlusione del suo lume. Si tratta di una patologia frequente: la seconda causa più frequente di intervento chirurgico in assoluto e la prima emergenza chirurgica sull'addome.

La diverticolosi è la più frequente malattia del colon e la sua incidenza è direttamente correlata all'età. Circa il 30% dei soggetti di età superiore ai 60 anni ne è affetta. Episodi infiammatori (diverticoliti) possono intervenire nel 5-20% dei casi. In genere si tratta di episodi unici; solo nel 30% dei casi sono ricorrenti.

Le infezioni delle vie biliari sono rappresentate da due diverse entità cliniche a diversa seppure contigua localizzazione: la colecistite e la colangite. Nella maggioranza dei casi tali infezioni sono correlate alla presenza di calcoli nella colecisti ed ostruzione del dotto cistico. L'appendicite, la diverticolite e le infezioni delle vie biliari, al pari di quanto già descritto a proposito della peritonite, sono sostenute da batteri presenti nel colon: quindi l'eziologia sarà polimicrobica e sarà rappresentata da batteri Gram positivi e Gram negativi, aerobi ed anaerobi. Tutte le infezioni intraddominali possono richiedere un atto chirurgico per giungere a risoluzione, ma la guarigione può anche essere ottenuta con la sola terapia medica. La somministrazione di antibiotici rappresenta comunque un aspetto cardine nella terapia delle infezioni intraddominali che deve comunque essere effettuata indipendentemente dall'intervento chirurgico. L'eziologia comune a tutte le infezioni intraddominali prevede la somministrazione per via parenterale di antibiotici ad ampio spettro con attività battericida rivolta sia ai microrganismi Gram positivi che Gram negativi, sia aerobi che anaerobi.

ASPETTI MICROBIOLOGICI DELLE INFEZIONI DELLE VIE URINARIE

G. Nicoletti, A. Speciale, C. Torrisi

Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche

Le infezioni delle vie urinarie (IVU) sono tra le più importanti cause di morbilità e di costo a carico del Sistema Sanitario Nazionale in soggetti di tutte le età e rappresentano anche la principale causa di batteriemie.

In particolare, le infezioni delle basse vie urinarie non complicate, rappresentate principalmente dalla cistite, dal punto di vista epidemiologico, costituiscono l'80% delle infezioni urinarie e le donne sono sicuramente il sesso maggiormente colpito.

Si stima che il 20% della popolazione femminile presenti almeno un episodio di cistite ogni anno.

L'eziologia delle IVU, pur riconoscendo quale principale agente l'*Escherichia coli* (~80%), varia in relazione a criteri clinici.

Nelle IVU non complicate, rappresentate prevalentemente dalla cistite, specie quali *E. coli* (80-90%) *Klebsiella* spp, *Proteus* spp, *Enterobacter* spp, *Staphylococcus saprophyticus* ed *Enterococcus*, sono i microrganismi causali, mentre nelle infezioni ricorrenti vengono quasi esclusivamente isolati *E. coli* e *Proteus*. L'eziologia cambia nel caso delle IVU complicate e nosocomiali dove assieme agli Enterobatteri, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. epidermidis* e miceti, costituiscono importanti agenti eziologici.

In base al limitato numero di microrganismi responsabili delle infezioni delle vie urinarie non complicate (cistite), l'approccio terapeutico è comunemente empirico, basato cioè sulle notizie epidemiologiche relative all'antibiotico-resistenza dei microrganismi causali.

In Italia si è osservata una carenza di dati sull'attuale antibiotico-resistenza dei patogeni urinari e su tali premesse è stato intrapreso uno studio osservazionale al fine di raccogliere dati sulla prevalenza dei microrganismi isolati e sulla relativa sensibilità alle molecole più comunemente adoperate per tale patologia (ciprofloxacina, norfloxacina, fosfomicina e cotrimossazolo).

ASPETTI MICROBIOLOGICI DELLE INFEZIONI INTRADDOMINALI.

Giovanni Russo – Giovanni Bonfiglio

Dipartimento di Scienze Microbiologiche e di Scienze Ginecologiche, Università degli Studi di Catania.

Per infezione intraddominale si intende la presenza di un processo infettivo nella cavità peritoneale; esso può essere localizzato o diffondersi per via sistemica con conseguenti danni organici molto gravi.

La più frequente di queste infezioni è rappresentata dalla peritonite generalizzata o localizzata. La peritonite a sua volta può essere primaria o secondaria a perforazione acuta o a un intervento chirurgico.

Tutte queste condizioni comportano l'efflusso di microrganismi endogeni del tratto enterico che portano a un'infezione intraddominale. I microrganismi responsabili possono essere sia aerobi che anaerobi e possono interagire tra di loro in maniera sinergica nel determinismo del danno locale o sistemico.

La terapia di queste infezioni si fonda pertanto sull'uso di combinazioni di due o più antibiotici o di molecole ad ampio spettro, particolarmente attive sui più comuni microrganismi causa di queste infezioni e capaci di superare le principali resistenze batteriche, come i carbapenemici e particolarmente meropenem.

Vengono riportati i risultati di uno studio condotto per tre anni su patogeni responsabili di infezioni intraddominali.

BSE E DINTORNI

Prof.ssa Paola Dall'Ara

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di Microbiologia e Immunologia Veterinaria, Università degli Studi di Milano

Nel novembre del 1986, sono stati descritti, nel Regno Unito, i primi casi di una nuova malattia che colpiva i bovini, denominata, per le sue peculiari caratteristiche, "malattia della mucca pazza" o, più scientificamente, "encefalopatia spongiforme del bovino" (*Bovine Spongiform Encephalopathy*, BSE), che si è andata ad aggiungere all'elenco delle peculiari encefalopatie spongiformi trasmissibili che colpiscono gli animali e l'uomo (come il famoso e ormai debellato *kuru*): dal quel momento si è assistito a una vera e propria epidemia, che ha interessato dapprima la sola Inghilterra e successivamente molti altri Paesi, Italia compresa.

Lo scoppio e la diffusione di tale singolare epidemia hanno allertato i ricercatori di tutto il mondo, nella previsione di un potenziale rischio di trasmissione della malattia dal bovino all'uomo. Quando la situazione sembrava ormai sotto controllo, e i consumatori avevano quasi dimenticato l'allarme "mucca pazza", un nuovo campanello d'allarme ha scosso l'intera comunità scientifica: sempre in Inghilterra, infatti, nel 1996 sono stati descritti i primi 10 casi di una nuova patologia dell'uomo, definita "variante giovanile" (vCJD) della classica malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD), che, oltre a rappresentare una forma del tutto atipica di CJD, mostra molte affinità con la BSE. E il dubbio è che proprio la BSE sia la causa di questa patologia umana, che oggi conta oltre 100 casi confermati (quasi tutti in Inghilterra), per un passaggio dell'agente eziologico dal bovino all'uomo, e che la probabile trasmissione si poteva evitare.

Ma non tutti la pensano così...

NUOVI METODI PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI BATTERI ADESI

Piara Valenti

Dipartimento di Medicina Sperimentale, II Università di Napoli.

Il metodo usualmente adottato per valutare il numero dei microorganismi, basato sulla determinazione delle Unità Formanti Colonia, può essere considerato idoneo ed attendibile per i microorganismi in forma planotonica, ma inappropriato per quelli in forma sessile.

Differenti saggi analitici sono disponibili per determinare quantitativamente i microorganismi adesi ad una superficie inerte o biologica. Tra questi, alcuni sono basati sulla conta dei microorganismi eluiti da una superficie di adesione. Tuttavia, questi metodi possono danneggiare i microorganismi e non ne assicurano la completa eluizione.

L'osservazione diretta dei microorganismi adesi mediante microscopio ottico, a scansione, elettronico o confocale e' un metodo ampiamente utilizzato, ma non determina la vitalità microbica. Pretrattando il campione con coloranti fluorescenti, si discriminano le cellule vive da quelle morte, ma la piccola porzione del materiale esaminato rende poco attendibile la determinazione del numero totale dei microorganismi adesi.

Altri metodi, definiti indiretti, correlano il numero dei microorganismi con la quantità di colorante adsorbito od eluito dalle cellule adese o con la quantità di isotopi radioattivi incorporati dai batteri. Tutti questi metodi soffrono di alcuni svantaggi: il primo ed il secondo potrebbero colorare solo i batteri degli strati superficiali o il colorante potrebbe essere assorbito anche al supporto d'adesione; il terzo e' influenzato dalla crescita microbica.

Altri saggi microbiologici, basati sulla determinazione dei prodotti del metabolismo microbico, possono essere applicati per contare microorganismi in forma sessile. Un saggio e' basato sulla riduzione del 2,3,5 trifenil tetrazolio cloruro ad opera del metabolismo microbico mentre un altro determina la CO₂ prodotta dai microorganismi. Entrambi i metodi devono essere eseguiti in condizioni di stretta anaerobiosi e non sono stati progettati per testare direttamente il materiale con i batteri adesi.

Altri due metodi, basati sul consumo dell'O₂ da parte di microorganismi o sul viraggio di un indicatore dovuto al metabolismo microbico, correlano il tempo necessario per lo svolgimento delle reazioni con il numero di microorganismi adesi. La peculiarità di questi due metodi e' rappresentata dal fatto che le celle di reazione permettono la conta microbica dei batteri adesi direttamente sul supporto contaminato, fornendo, con un notevole limite di sensibilità, dati analitici ripetitivi ed affidabili.

TIPIZZAZIONE TRAMITE MICROARRAY: STUDIO DEI GENOTIPI DI HPV COME MODELLO SPERIMENTALE

Morandi L.

Alphagenics Diaco Biotechnologies S.r.l. Area Science Park Padriciano 99 (TRIESTE)

Studi epidemiologici hanno evidenziato che l'infezione persistente da virus del papilloma umano (HPV) è la prima causa di cancro alla cervice uterina. E' stato stimato che anche il 25% dei tumori del cavo orale siano associati alla presenza di HPV. Ad oggi sono stati identificati più di 85 genotipi diversi, tra cui quelli definiti ad alto rischio (HPV16, 18, 31, 33, 45, 56, 58) e a basso rischio (HPV6, 11, 34, 40, 42, 43, 44) in base alla loro associazione con lesioni maligne o benigne. La tipizzazione di HPV con sistemi molecolari è determinante per il completamento della diagnosi citologica e istologica. Dato l'alto numero di genotipi da identificare, le tecniche classiche come l'ibridazione in situ si caratterizzano per la loro durata eccessiva, la bassa sensibilità e per l'incompletezza dei risultati. La tecnologia tramite microarray consente invece la tipizzazione in contemporanea di tutti i genotipi in un unico saggio. Attraverso la microdeposizione di sonde oligonucleotidiche a DNA su superfici circolari di 100 µm di diametro, Alphagenics ha progettato un microarray con quattro diverse sonde genotipo specifiche per ciascuno degli 85 HPV noti. Queste sonde sono state fatte aderire in quintuplicato su una superficie complessiva di circa 256 mm² (totale 1600 spot). La porzione L1 di HPV da DNA estratto da cellule cervicali raccolte nella "Cell slide Solution" (Alphagenics International) e da biopsie in paraffina, è stata amplificata tramite PCR con primers di consenso (MY09-MY11) marcati col fluorocromo Cy3. Il frammento ottenuto è stato ibridato al microarray a 55°C per un'ora. Dopo alcuni lavaggi, il segnale di fluorescenza è stato analizzato tramite uno scanner confocale laser assistito. Attraverso un software di gestione della collocazione spaziale, della misurazione dell'intensità di ogni singolo spot, e della sottrazione del background circostante relativo ad ogni sonda, è stato possibile definire il genotipo di ciascun campione. La sensibilità del sistema è di 10-20 copie di HPV16 ed è stata valutata con diluizioni scalari di DNA di cellule SiHa (1-10 HPV16 integrati per cellula). Non sono state notate cross-reattività tra le varie sonde relativamente ai diversi genotipi. Questo sistema può rappresentare una valida alternativa ai saggi oggi in uso per determinare la presenza e il genotipo di HPV da vari campioni di partenza quali cellule nella "Cell Slide Solution", biopsie fresche o in paraffina, sperma, con applicazioni in diagnostica ginecologica, dermatologica e nello studio dei tumori del cavo orale.

VIRUS ERPETICI COME VETTORI VACCINALI

Roberto Manservigi, Rafaela Argnani, Peggy Marconi

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica, Sezione di Microbiologia, Università di Ferrara, Ferrara, Italy

I virus dell'Herpes simplex (VHS) possono essere utilizzati come vettori per diverse applicazioni che riguardano la salute pubblica. Queste includono la veicolazione e l'espressione di geni al sistema nervoso centrale, la distruzione selettiva di cellule tumorali, la vaccino-terapia e la vaccino-profilassi nei confronti di malattie infettive. In particolare, i vettori erpetici per uso vaccinale devono essere geneticamente stabili, incapaci di riattivarsi e di diffondere da individuo a individuo e di replicarsi nel SNC, ma comunque immunogenici e protettivi nei confronti di agenti infettivi.

Attualmente esistono tre tipi di vettori basati su VHS-1: ampliconi, vettori non replicativi e vettori replicativi attenuati. Gli ampliconi sono vettori il cui genoma è costituito da copie multiple di DNA plasmidico contenente l'origine di replicazione e le sequenze di incapsidamento virali. In presenza di un sistema *helper* il plasmide viene racchiuso negli involucri virali con la formazione di pseudoparticelle. I vettori non replicativi sono costituiti da mutanti con delezioni in uno o più geni essenziali per il ciclo litico. Questi mutanti possono moltiplicarsi solo in linee cellulari di complementazione che esprimono il gene virale deletato. I vettori replicativi attenuati sono costituiti da mutanti con delezioni in uno o più geni non essenziali per la moltiplicazione in colture cellulari. La rimozione di questi geni diminuisce la neuropatogenicità virale e per la crescita del virus non sono necessarie linee cellulari di complementazione.

In particolare, come vettori vaccinali, gli ampliconi presentano alcuni vantaggi nei confronti di altri sistemi vettoriali. In primo luogo sono assolutamente apatogeni per le cellule infettate poiché il loro genoma non possiede geni virali. In secondo luogo, il carattere ripetitivo del genoma dell'amplicone permette l'introduzione, nella cellula infettata, di copie multiple del transgene, con un conseguente aumento dell'espressione. Inoltre le proprietà pantropiche delle particelle di VHS, che sono conservate nell'amplicone, permettono l'infezione di un ampio spettro cellulare, comprese le cellule dendritiche. Infine, gli ampliconi dovrebbero favorire la presentazione dell'antigene sia nel contesto degli antigeni di istocompatibilità di classe I (MHC-I) che di classe II (MHC-II).

Nel nostro laboratorio l'applicabilità di questi vettori è attualmente valutata utilizzando due diversi modelli virali: HIV-1 e HCV.

IL SISTEMA LCX PER LA DETERMINAZIONE DI HIV-1 RNA: CARATTERISTICHE E CONFRONTO CON NUCLISENS

E. Tanzi, A. Amendola, D. Colzani

Istituto di Virologia, Università di Milano

Obiettivi: valutare le caratteristiche di un sistema basato sulla metodologia RT-PCR (Abbott LCx HIV RNA Quantitative) in confronto ad un metodo di amplificazione isoterma (Organon NucliSens) nella determinazione quantitativa di HIV-1-RNA.

Metodi: sono stati studiati 60 pazienti HIV-1 positivi, di cui 22 in trattamento con HAART (*Gruppo A*) e 38 sottoposti a vaccinazione anti-influenzale nella stagione 1998-99 (*Gruppo B*). Il test NucliSens è stato condotto su campioni di plasma fresco (n=145 e n=143 rispettivamente per i gruppi A e B) raccolti durante il follow-up. I campioni, conservati a -80°C, sono stati quindi analizzati con il sistema LCx che prevede l'amplificazione dell'RNA target con uno standard interno (RT-PCR competitiva) seguita da rilevazione del segnale tramite tecnologia MEIA su analizzatore automatico: il rapporto tra fluorescenza emessa dallo standard interno e dalla sequenza target viene comparato ad una curva di calibrazione esterna a 6 punti. La sensibilità del metodo è di 178 cp/ml e di 50 cp/ml, rispettivamente per un volume di campione di 0.2 ml o di 1 ml, con un range dinamico di 5 log.

Risultati: La precisione del metodo LCx, valutata su campioni di controllo, variava dal 2.6% al 6.2%. Nel *Gruppo A* la sensibilità dei due metodi è risultata simile (concordanza del 90.3%), con tendenza dell'LCx a fornire valori più elevati. Differenze significative (>1 log) sono state evidenziate in 12 campioni (8.3%) e almeno in un campione per paziente nel 50% dei casi (11/20); tuttavia l'andamento complessivo nel corso del follow-up è risultato molto simile per tutti i soggetti studiati.

La rilevazione quantitativa di HIV-1-RNA tra i pazienti del *Gruppo B*, saggiati per valutare gli effetti della stimolazione vaccinale sulla replicazione di HIV-1, ha mostrato differenze >1 log tra i due metodi nel 29% (11/38) dei casi. Variazioni significative (>0.5 log) della carica virale sono state evidenziate, con entrambi i metodi, in 6 soggetti (15.8%) ed in altri 5 (13.2%) con il solo NucliSens.

Conclusioni: Il sistema LCx, rapido e semplice nelle fasi tecniche esecutive, ha mostrato ottima riproducibilità e precisione. L'analisi comparativa dei due metodi utilizzati ha rivelato andamenti molto simili della carica virale nel corso del follow-up dei pazienti in studio, anche in presenza di differenze significative nei valori assoluti. Il metodo LCx appare quindi adeguato per il monitoraggio della carica virale di pazienti HIV-1 positivi, sottoposti o meno a terapia antiretrovirale.

PROBIOTICI NEI DISMICROBISMI INTESTINALI

Elisa Bertazzoni Minelli

Dip. Medicina e Sanità Pubblica- Cattedra di Chemioterapia

Università di Verona

Una flora batterica intestinale stabile ed equilibrata contribuisce al benessere dell'organismo. Presenza di antibiotici, patologia gastrointestinale -interventi chirurgici compresi- fattori ambientali e dietetici possono alterarla profondamente.

Il rinnovato interesse verso i probiotici è causato da reazioni avverse agli antibiotici e dall'aumento della resistenza batterica, così come dal potenziale uso nel trattamento di diverse patologie gastrointestinali a eziologia multifattoriale. Numerosi dati di letteratura supportano l'uso di probiotici per prevenire o trattare infezioni intestinali e altri disturbi legati all'alterazione dell'ecosistema intestinale, cioè dismicrobismi in senso lato. I probiotici più studiati sono i batteri lattici, in particolare lattobacilli e bifidobatteri, ma sono impiegati anche streptococchi, enterococchi, propionobatteri, bacilli, saccharomyces, ecc.

I probiotici esercitano azione protettiva con diversi meccanismi, per lo più non noti, inibendo la colonizzazione di batteri patogeni, contribuendo a mantenere stabile l'ecosistema con le diverse funzioni metaboliche, modulando risposte infiammatorie e immunitarie, locali e sistemiche. Non tutti i probiotici esercitano gli stessi effetti e con la stessa intensità. Si sono dimostrati efficaci nelle diarree acute infettive batteriche e virali (rotavirus) del bambino e dell'adulto, nell'enterocolite da antibiotici e nella prevenzione delle infezioni e ricadute da *C.difficile*. I risultati nell'adulto sono più variabili, come nella profilassi della diarrea del viaggiatore e nella gastroenterite da *H.pylori*. Promettenti campi di impiego sono le malattie infiammatorie intestinali -colite ulcerativa, morbo di Crohn, colon irritabile- pouchite, pancreatite cronica. I probiotici migliorano condizioni di intolleranza al lattosio e deficit di sucrali-maltasi; inoltre modulano la risposta immunitaria verso alcuni patogeni e in altre condizioni (dermatite atopica). L'efficacia clinica risulta variabile a seconda dell'età, della patologia, delle modalità e condizioni d'impiego come anche del tipo di batterio, soprattutto ceppo, e della quantità di microrganismi, se usati da soli o associati. Basso numero di pazienti studiati, mancanza di gruppi di controllo o di placebo rendono difficile l'interpretazione dei risultati. Recentemente sono disponibili risultati di studi clinici controllati.

I probiotici risultano utili nei dismicrobismi intestinali con risultati soddisfacenti, selezionando ceppi con specifiche caratteristiche di attività e sicurezza, adatti alle diverse esigenze e per un uso mirato.

AMBIENTE SUOLO: BIODIVERSITÀ DELLA CORTE MICROBICA DELLE PIANTE

Marco Bosco, Christine Picard

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Area di Microbiologia Agraria

Università di Bologna, Via Filippo Re, 6 - 40126 Bologna

Il nostro gruppo è impegnato nello studio della diversità e dell'ecologia di batteri e funghi dell'ambiente suolo, con particolare riguardo ai ceppi che costituiscono la corte microbica benefica, simbiote e associata, di piante agrarie come *Vitis vinifera* e *Zea mays* e forestali. Queste conoscenze, purtroppo ancora limitate, sono indispensabili per valutare correttamente i microrganismi come fattori della produzione agraria e forestale, e l'impatto ambientale degli inoculi microbici selezionati per l'impiego nell'agricoltura biologica, nella filiera vivaistica e nel ripristino ambientale sostenibile.

L'esperienza acquisita in passato nello studio dell'ecologia molecolare della simbiosi azotofissatrice *Frankia-Alnus* in ambienti naturali è risultata preziosa per impostare ricerche più recenti, di interesse agroambientale, sulla corte microbica micorrizosferica di piante agrarie in pieno campo.

Vista l'importanza attuale e futura dell'agricoltura a basso *input*, stiamo studiando la diversità dei *biofilm* microbici presenti sulle radici di due varietà di *Vitis vinifera* allevate da vari anni secondo il metodo biologico. Mediante metodi tradizionali e analisi di PCR quantitativa eseguite sul DNA estratto direttamente dal suolo vengono quantificati i rizobatteri capaci di solubilizzare i fosfati minerali e di produrre auxine ed altre molecole bioattive, per correlarli con la diversità dei funghi micorrizici arbuscolari. I risultati finora ottenuti indicano che tutte le radici analizzate presentano *biofilm*, già all'inizio della stagione vegetativa, composti da un elevato numero di taxa batterici di interesse agroambientale e da almeno due famiglie (*Glomaceae* e *Gigasporaceae*) di funghi AM identificabili via PCR.

La diversità genetica delle popolazioni naturali di batteri che producono l'antibiotico DAPG nella micorrizosfera viene studiata secondo il modello da noi sviluppato per valutare l'importanza delle *Pseudomonas* fluorescenti come agenti di biocontrollo in pieno campo. Nel mais i risultati indicano che i batteri produttori di DAPG possono colonizzare la rizosfera durante tutto il suo sviluppo. Poiché tale colonizzazione variava quantitativamente nel tempo, la composizione dei *biofilm* batterici in mais è stata analizzata mediante analisi molecolari (ARDRA, RAPD, AMOVA), dimostrando un'elevata variabilità. Alcuni genotipi, che risultavano molto rappresentati, hanno dimostrato una grande capacità di colonizzare le radici quando sono stati reinoculati su mais in microcosmo.

ZOONOSI ELMINTICHE: L'IMPATTO DELLE NUOVE SPECIE DI *TRICHINELLA*.

Fabrizio Bruschi fbruschi@med.unipi.it

Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, Università di Pisa, Scuola Medica, Via Roma, 55 Pisa

La trichinellosi è una zoonosi parassitaria causata da un nematode appartenente al genere *Trichinella*. In teoria, tutti i mammiferi (e non solo) sono suscettibili all'infezione che può essere causata da più specie. Oggi ne conosciamo almeno otto diverse (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, *T. nelsoni*, *T. murrelli*, *T. papuae* ed una nuova specie isolata in Africa, *T. zymbawensis*) più tre distinti genotipi, grazie all'impiego di tecniche biochimiche e molecolari.

La trichinellosi è una zoonosi riemergente in varie aree geografiche (Europa, Asia, America Latina) ed interessa anche paesi sviluppati come l'Argentina dove dal 1993 l'incidenza di casi umani è aumentata di sette volte (Murrell & Pozio, 2000 Int. J. Parasitol. 30:1339).

L'uomo è particolarmente suscettibile a sviluppare un quadro clinico con interessamento dell'apparato gastroenterico prima e successivamente del muscolo scheletrico che rappresenta l'habitat ideale per il parassita. Dati sperimentali hanno dimostrato che la risposta dell'ospite, a livello muscolare, alle varie specie di *Trichinella* varia soprattutto in rapporto alla capacità di queste di indurre la formazione della capsula (specie incapsulate come *T. spiralis*, per esempio) o di non indurla (specie non incapsulate come *T. pseudospiralis*); infatti la risposta infiammatoria alle prime è molto più intensa che alle seconde.

La descrizione di nuove specie come *T. murrelli* e *T. papuae*, come pure il verificarsi di infezioni umane causate da *T. pseudospiralis*, una specie ritenuta capace fino a poco tempo fa di infettare solo gli animali, richiede la necessità di modificare l'approccio clinico-diagnostico alla trichinellosi umana, dal momento che gran parte delle conoscenze attuali si basa sulle infezioni causate dalla specie originariamente descritta, vale a dire *T. spiralis* (Bruschi & Murrell, 2002 Postgrad. Med. J.78:15).

RUOLO DELLE PROTEINE ISTONE-SIMILI NELL'ESPRESSIONE DEL REGULONE DI INVASIVITÀ IN SHIGELLA.

Gianni Prosseda (1), Maurizio Falconi (2) e Bianca Colonna (1)

Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università di Roma "La Sapienza"

Dipartimento di Biologia MCA, Università di Camerino, Camerino (MC)

In *Shigella* ed *E.coli* enteroinvasivi i geni di virulenza, necessari per l'adesione, penetrazione e moltiplicazione intracellulare, localizzati su un grande plasmide, sono attivati a 37°C con un meccanismo a cascata da due proteine, VirF e VirB e sono mantenuti silenti a 30°C ad opera della proteina istone simile H-NS. Le proteine istone-simili (o proteine del nucleoside) quali HU, H-NS, FIS, IHF, StpA sono proteine di basso peso molecolare, molto abbondanti le quali, oltre a svolgere un ruolo fondamentale nel compattamento del DNA batterico, sono coinvolte in numerosi processi di regolazione e ricombinazione. Tra le proteine del nucleoside H-NS è sicuramente il più importante regolatore globale in quanto regola oltre all'espressione dei geni strutturali della cellula anche numerosi geni coinvolti nella patogenicità. Nonostante il processo di termoregolazione nell'espressione dei geni di virulenza sia diffuso tra i batteri patogeni non vi è un modello unitario per spiegare il silenziamento o l'attivazione dei geni in risposta alla temperatura. Per cercare di approfondire il meccanismo molecolare con il quale vengono attivati nell'ospite i geni plasmidici di virulenza abbiamo analizzato a livello sia genetico che molecolare come la temperatura moduli le interazioni tra H-NS ed il promotore del gene *virF* considerato come bersaglio privilegiato nel processo di termoregolazione, vista la sua "pole position" nella cascata regolativa. Sul promotore *virF* sono state identificate due regioni riconosciute da H-NS solo a bassa temperatura, separate tra loro da una regione dotata di curvatura intrinseca. Tenendo conto che nel passaggio da 30°C a 37°C si osserva contemporaneamente sul promotore di *virF* una diminuzione della curvatura, dell'affinità di legame di H-NS e della repressione della trascrizione è stato possibile ipotizzare che il processo di termoregolazione dipenda proprio da modificazioni strutturali nel DNA della regione regolatrice.

Da questo studio emerge quindi quanto siano importanti le variazioni nella conformazione del DNA, indotte sia da cambiamenti di parametri ambientali che dall'interazione con le proteine istone simili, nella modulazione dell'espressione dei geni plasmidici di virulenza in *Shigella*.

ASPETTI MICROBIOLOGICI E APPLICATIVI DELLO STUDIO DELLE POPOLAZIONI MICROBICHE RICORRENTI NELLA PREPARAZIONE DI ALIMENTI FERMENTATI

Salvatore COPPOLA e Danilo ERCOLINI

Università degli Studi di Napoli Federico II

Dipartimento di Scienza degli alimenti

Sezione di Microbiologia agraria, alimentare e ambientale e di Igiene

Portici

Le popolazioni microbiche ricorrenti nei processi di produzione degli alimenti fermentati sono caratteristiche di ogni tipo di prodotto.

Il monitoraggio delle specie e dei ceppi microbici che le compongono è interessante per verificare l'andamento dei processi fermentativi e per accertare la qualità e la tipicità delle preparazioni finali.

Questi studi possono essere svolti attraverso approcci diversi, anche combinati, nell'ambito dei quali quelli fondati sull'applicazione di tecniche molecolari sono risultati particolarmente utili.

Sono riportate applicazioni della PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) e della FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) allo studio di materiali e processi riguardanti il settore lattiero-caseario e quello dei prodotti carnei insaccati, riferendo sulle potenzialità e sui limiti di questi metodi definiti nel corso di approcci polifasici ed evidenziando risultati inattesi che suggeriscono una revisione di procedure microbiologiche da tempo consolidate.

RECENTI PROGRESSI NELLO SVILUPPO DI UN NUOVO VACCINO CONTRO LA TUBERCOLOSI.

Giovanni Delogu

Sezione di Microbiologia Sperimentale e Clinica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli studi di Sassari.

Il Bacillo di Calmette and Guerin (BCG) è l'unico vaccino attualmente a disposizione per la prevenzione della tubercolosi (TB), ed ha dimostrato negli oltre 80 anni di applicazione una buona efficacia nel prevenire la malattia nei bambini, in particolare riducendo il tasso di mortalità dovuto alla meningite tubercolare. Viceversa, l'efficacia di BCG nel prevenire la TB negli adulti, ed in particolare nelle aree del pianeta dove l'endemia di TB è più elevata, si è dimostrata controversa. Inoltre, l'impossibilità di utilizzare BCG in soggetti HIV-positivi ha reso ancora più urgente lo sviluppo di un nuovo vaccino. Tra le strategie adottate per sviluppare un nuovo vaccino sperimentale le più promettenti sono: un nuovo vaccino vivo, ottenuto migliorando l'immunogenicità di BCG o attenuando ceppi virulenti di *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb); vaccini sperimentali a subunità o vaccini a DNA, che inducono una risposta immunitaria nei confronti di uno a più antigeni. Le caratteristiche dei vari vaccini verranno discusse. È opinione comune che una migliore conoscenza dei meccanismi immunologici associati alla TB, nonché del meccanismo dell'azione patogena messo in atto da Mtb siano necessari per disegnare e mettere a punto un vaccino capace di stimolare una risposta immunitaria protettiva. A tal fine la valutazione preclinica nel modello animale murino può fornire importanti informazioni sull'attività protettiva del vaccino e sul tipo di risposta immunitaria correlata. Verranno presentati e discussi i risultati relativi a due vaccini sperimentali attualmente in studio. Nel primo caso verranno presentati i risultati relativi ad uno studio con un cocktail di vaccini a DNA costituito da 10 plasmidi, ciascuno codificante per un singolo antigene di Mtb. I topi immunizzati con tale combinazione di antigeni hanno sviluppato una intensa risposta immunitaria di tipo Th1, specifica per Mtb e capace di controllare l'infezione. Sulla base di diversi parametri immunopatologici si è determinato che l'efficacia del vaccino a DNA in studio era equivalente a quella indotta da BCG.

Un diverso approccio sperimentale è stato seguito per mettere a punto un vaccino in grado di bloccare il processo di disseminazione di Mtb. Tale vaccino è diretto contro la proteina HBHA di Mtb che media il processo di disseminazione dal sito di infezione primaria. Le caratteristiche dei vaccini sperimentali in studio ed alcuni risultati preliminari ottenuti nel modello di TB murino verranno discusse.

L'UTILIZZO DI ROBOT NEL LABORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE: PREPARAZIONE, DETERMINAZIONE ED ANALISI DI CENTINAIA DI MICROSATELLITI.

Capanni P., Fardin P., Ferrara G.B.

Laboratorio di Immunogenetica, IST/CBA Largo Rosanna Benzi 10, Genova.

I microsatelliti sono corte sequenze ripetute in tandem sparse in modo omogeneo lungo tutto il genoma. Il numero di queste ripetizioni è molto variabile nella popolazione e ciascun individuo possiede in genere un numero diverso di copie della ripetizione in ciascun locus. Un microsatellite è utile quando è molto comune nella popolazione, così che esiste un'alta probabilità che i genitori di un individuo portino marcatori distinguibili. Poiché si localizzano sia in prossimità dei geni che nelle regioni introniche ed essendo ereditati secondo le leggi Mendeliane, possono essere usati come marcatori genetici.

Il nostro laboratorio si avvale del Multiprobe II HT Expanded (Packard Biosystem), un robot di ultima generazione capace di eseguire metodiche routinarie di laboratorio in tempi brevi e con un'alta efficienza e riproducibilità.

L'utilizzo di sistemi automatizzati può essere vantaggioso per la localizzazione dei loci putativi dei geni responsabili della GVHD.

Partendo dalle linee cellulari di PBL immortalizzate con EBV il robot è in grado di estrarre il DNA di più individui in breve tempo; di predisporre ed eseguire una metodica di PCR e infine di preparare i campioni per essere sequenziati.

Il sequenziamento viene eseguito tramite un sequenziatore automatico ABI PRISM 3100 a 16 capillari per valutare le dimensioni dei microsatelliti al fine di individuare antigeni minori di istocompatibilità.

STRATEGIE PER LA MESSA A PUNTO DI VACCINI VERSO PATOGENI VAGINALI: L'ESEMPIO DI *TRICHOMONAS VAGINALIS*

Pier Luigi Fiori

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

Nonostante le infezioni trasmissione sessuale (STD) siano una frequente causa di malattia sia nei paesi industrializzati che in quelli in via di sviluppo, non è ancora stata messa a punto una prevenzione vaccinale per la maggior parte di esse. Gli agenti eziologici delle STD sono rappresentati da una ampia gamma di microrganismi tra loro notevolmente differenti, quali virus, batteri, funghi e protozoi. Uno dei principali problemi nella messa a punto di vaccini protettivi verso agenti causa di infezioni vaginali è legata alla particolare nicchia ecologica nella quale si sviluppa l'infezione. Nelle strategie per la produzione di vaccini protettivi occorre quindi non solo caratterizzare i meccanismi e gli effettori di patogenicità del microrganismo, ma anche i meccanismi della risposta immunitaria dell'ospite (sia la risposta specifica che quella innata) e i complessi rapporti che i microrganismi stessi sviluppano nei confronti della flora residente e di altri patogeni spesso associati.

Trichomonas vaginalis rappresenta per diversi motivi, un interessante modello per lo studio di strategie vaccinali verso STD: è l'agente eziologico di una delle più frequenti infezioni vaginali, presente in tutti i paesi del mondo; è un microrganismo complesso, essendo un eucariote; elabora meccanismi di patogenicità differenti (produzione di proteasi, secrezione di molecole tossiche, meccanismi di fuga dalle difese dell'ospite ecc.); stabilisce rapporti di simbiosi con altri patogeni vaginali e stabilisce importanti associazioni con altri agenti causa di STD; induce lo sviluppo di immunità sia innata che adattativa.

In questa relazione verranno presentate i diversi approcci sperimentali volti a caratterizzare i principali immunogeni protozoari, potenzialmente protettivi, verrà discussa l'influenza dei microrganismi associati nella modulazione dei meccanismi di patogenicità e nella fisiologia del protozoo, verranno presentati i complessi (e per buona parte ancora ignoti) rapporti tra il microrganismo e lo sviluppo dei sistemi di vigilanza dell'ospite basati sui meccanismi di immunità innata. Infatti sembra ipotizzabile che solo l'uso di diverse molecole del microrganismo che possano indurre l'attivazione simultanea dell'immunità innata e di quella specifica possa portare alla produzione di vaccini realmente efficaci nella prevenzione dell'infezione.

ASPETTI CLINICI DELLE INFEZIONI POLMONARI NEL TERRITORIO.

Dott.Saverio Mirabella *-Dott.ssa Donatella Catanzaro **

Σ * Div.Pneumologia Ospedaliera Osp.Ascoli-Tomaselli Catania

Σ ** Div.Pneumologia Ospedale G.Bosco Torino

La broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), nel mondo occidentale, rappresenta la malattia polmonare cronica più comune, la cui frequenza è in netto e costante aumento negli ultimi anni e che da sesta causa di mortalità degli anni '90, nel 2020 rappresenterà la terza causa di mortalità e la quinta di morbilità.

Questa tendenza è da mettere in correlazione con la persistenza dei più importanti fattori di rischio (fumo, inquinamento ambientale etc) ed in particolare; con l'aumento dell'età media della popolazione.

La storia naturale della BPCO è caratterizzata da frequenti episodi di riacutizzazione (AECB), in genere da 4 a 6 episodi per anno, che si manifestano con un progressivo peggioramento della sintomatologia, a volte accompagnata anche da episodi di insufficienza respiratoria acuta.

Le riacutizzazioni della BPCO rappresentano la principale causa di ricorso al medico generico e/o di ricovero ospedaliero, incidendo sulla qualità della vita e nei pazienti più anziani, specie con altre comorbidità importanti, quali diabete, insufficienza renale, scompenso cardiaco congestizio, sono associate ad elevato tasso di mortalità.

Notevoli i costi sociali legati alla malattia.

I più recenti studi epidemiologici dell'ultimo decennio evidenziano che circa il 60% delle riacutizzazioni è di origine infettiva di cui il 70% di origine batterica, mentre, l'eziologia virale incide per il restante 30%.

I principali agenti patogeni associati a riacutizzazione di BPCO sono:

Batteri: (70% delle esacerbazioni infettive):	Gram-negativi difficili:	Gram-positivi difficili:	Virus (30% delle esacerbazioni infettive)
Haemophilus influenzae	Enterobatteriacee	Staphylococcus aureus	Virus influenzale /parainfluenzale
Moraxella catarrhalis	Pseudomonas aeruginosa		Rhinovirus-adenovirus
Streptococcus pneumoniae			Virus respiratorio sinciziale.
Chlamydia pneumoniae			

E' stata studiata una correlazione tra peggioramento della funzionalità respiratoria ed eziologia microbica ed è stato osservato che negli stadi meno avanzati della riacutizzazione sono prevalenti H.influenzae, M.catarrhalis e S.Pneumoniae mentre negli stadi più gravi sono presenti le enterobatteriacee e Pseudomonas species.

La terapia delle riacutizzazioni si basa essenzialmente sull'impiego di broncodilatatori, cortisonici, ossigenoterapia, se indicata, e degli antibiotici. Per quanto riguarda l'uso degli antibiotici bisogna segnalare che i patogeni respiratori nell'ultimo decennio hanno modificato la loro sensibilità ai principali chemioantibiotici: sono stati segnalati ceppi di S.pneumoniae resistenti a penicillina ed aminopenicilline e ceppi di H.influenzae e M.catarrhalis produttori di beta-lattamasi.

La tipologia dei pazienti, la severità della malattia, in base ai test di funzionalità respiratoria, la presenza di comorbidità o di altri fattori di rischio e la distribuzione degli agenti patogeni sono fattori importantissimi per instaurare una opportuna terapia antibiotica in modo da ottenere come risultati il controllo della sintomatologia, la prevenzione delle riacutizzazioni, le eventuali complicanze ed il ricovero ospedaliero.

REGOLAZIONE TRASCRIZIONALE E POST-TRASCRIZIONALE DELL'OPERONE *OSP-B-APY* PRESENTE SUL PLASMIDE DI VIRULENZA DI *SHIGELLA FLEXNERI* ED *ESCHERICHIA COLI* ENTEROINVASIVI (EIEC).

M. Nicoletti e D. Santapaola.

Dip.di Sc. Biomediche, Univ. "G. D'Annunzio", Chieti.

S. flexneri ed *E. coli* enteroinvasivi sono patogeni che causano diarrea e dissenteria bacillare nell'uomo. I batteri invadono le cellule epiteliali del colon causando una intensa reazione infiammatoria e distruzione di estese aree tissutali. I geni necessari per la penetrazione e la moltiplicazione intracellulare sono presenti in una regione di DNA di circa 30-kb del plasmide di virulenza (pINV) di 220-kb. Tale regione contiene i geni *mxi-spa*, che codificano un sistema di secrezione di tipo III, necessario per la secrezione e l'internalizzazione nella cellula ospite degli effettori di virulenza IpaA-D, IpgB1 e IpgD, i chaperoni IpgC e IpgE, e VirB. L'espressione di questi geni è regolata dai due attivatori trascrizionali VirF e VirB e dal regolatore H-NS. A 37°C VirF attiva la trascrizione di *virB* che, a sua volta, attiva la trascrizione dei geni sopra menzionati. Nonostante le conoscenze acquisite, alcuni aspetti del meccanismo di patogenicità dei batteri enteroinvasivi sono da chiarire. I geni *ospB* ed *apy* sono localizzati adiacenti sul pINV, al di fuori della regione di 30-kb, e codificano due proteine associate con la virulenza: *apy* una apirasi o ATP-difosfoidrolasi, una proteina periplasmica in grado di idrolizzare i dNTP; *ospB*, situato a monte di *apy*, un effettore secreto dal sistema di tipo III. La regione di DNA contenente *ospB* ed *apy* è fortemente conservata nei batteri enteroinvasivi ed i due geni sono co-trascritti in un mRNA bicistronico di circa 2-kb a partire da un promotore a monte di *ospB*. L'espressione dell'operone è regolata dalla temperatura ed è sotto il controllo dello stesso sistema regolativo (H-NS, VirF e VirB) che regola l'espressione dei geni di virulenza. L'mRNA bicistronico è processato nella regione intercistronica dall'enzima endoribonucleolitico RNase E dando luogo ad accumulazione di un trascritto *apy*-specifico più abbondante e più stabile del trascritto bicistronico, ad una rapida degradazione della regione del messaggero a monte di *apy* ed all'espressione differenziata dei due geni. La trascrizione dell'operone è fortemente influenzata dalla densità batterica ("quorum-sensing") e raggiunge il suo massimo quando i batteri entrano nella fase tarda-esponenziale precoce-stazionaria.

Per identificare il ruolo dell'operone nel meccanismo di patogenicità dei questi batteri abbiamo clonato i due geni in vettori di espressione opportuni e costruito mutanti nulli di *ospB* e *apy*. Risultati preliminari saranno illustrati e discussi.

NUOVE PROSPETTIVE PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA MICRORGANISMI IN FORMA SESSILE.

L. Selan (Università di Roma "La Sapienza")

L'allungamento della vita media, il miglioramento della qualità della vita e l'affinamento delle tecniche nel campo medico-chirurgico sono fattori che concorrono a diffondere l'uso di endoprotesi artificiali in molti campi: cardiovascolare, ortopedico, oculistico, etc. Questo fenomeno genera nuove patologie alle quali il mondo medico risulta totalmente impreparato: le infezioni batteriche in fase sessile. Tutti i dispositivi impiantabili sono potenziale sede di infezione da biofilm, a prescindere dal biomateriale usato. Nei soggetti portatori di infezioni su endoprotesi artificiali è stato descritto: una lunga fase asintomatica di latenza; la graduale comparsa di segni clinici aspecifici, subdoli ed intermittenti; l'evoluzione lenta del quadro clinico; l'improvviso aggravamento; l'assoluta refrattarietà alla terapia antibiotica; l'altissimo rischio di recidiva sulle protesi sostituite; l'altissima mortalità. Queste infezioni sono sostenute da batteri poco virulenti, comuni saprofiti dell'uomo e dell'ambiente. L'agente eziologico responsabile appartiene alla specie *Stafilococco* nel 70-80% dei casi (CNS nel 90%).

Le infezioni sono classificate come perioperatorie, *middle distance*, *long distance*. Molti tentativi sono stati effettuati per la loro prevenzione e cura:

- la profilassi antibiotica perioperatoria
- la terapia antibiotica protratta nel tempo
- l'uso di molecole antibiotiche con scarso ingombro sterico potenzialmente capaci di permeare la matrice del biofilm
- l'uso di protesi impregnate di antibiotico
- l'uso di terapie combinate fra vari tipi di antibiotici
- l'uso di protesi impregnate di sostanze antibiofilm (sali d'argento)

Fino ad oggi nessuno di questi tentativi ha raggiunto l'obiettivo; queste strategie sono valse a contenere l'evoluzione clinica senza mai eradicare queste infezioni, e senza ridurre la mortalità.

Possibili strategie terapeutiche si basano sull'uso di molecole che disgregano o inibiscono la sintesi della matrice del biofilm; in questo modo le difese dell'ospite e gli antibiotici potrebbero essere recuperare efficacia.

L'efficacia della terapia è strettamente legata anche alla precocità della diagnosi. Le analisi microbiologiche seguono sempre l'intervento di sostituzione, quindi non valgono a guidare il clinico sulla scelta terapeutica chirurgica o medica. Fino ad oggi la diagnosi preoperatoria ha utilizzato tecniche radiologiche (LEUCOSCAN, RM, TAC, US) e analisi chimico-cliniche aspecifiche (VES, emocromo, etc); recentemente sono state messe a punto alcune tecniche immunodiagnostiche innovative.

CONVERSIONE LISOGENICA E PATOGENICITÀ IN *SALMONELLA*

Sergio Uzzau

Sezione di Microbiologia Sperimentale e Clinica

Dipartimento di Scienze Biomediche

Università di Sassari

L'acquisizione graduale di isole di patogenicità, fagi, sequenze di inserzione e plasmidi ha giocato un ruolo di primo piano nell'evoluzione della virulenza dei batteri patogeni. Nelle linee evolutive principali del genus *Salmonella*, queste regioni di DNA hanno una diversa distribuzione, corrispondente all'espansione del numero di specie animali alle quali i serovars di *Salmonella* si sono adattati. Le differenze genetiche più evidenti consentono di distinguere due specie: *S. enterica* e *S. bongori*. Degli oltre 2000 serovars di *Salmonella*, pochi appartengono alla *S. bongori* e alle sottospecie II-VII di *S. enterica* e sono isolati prevalentemente da rettili. La maggior parte, invece, sono tra loro molto omogenei geneticamente e appartengono alla sottospecie I di *S. enterica* ma, nel contempo, presentano una straordinaria varietà di specie animali ospiti. Data la stretta relazione genetica dei serovars della sottospecie I di *S. enterica*, quali sono le basi genetiche del loro diverso adattamento all'ospite? Quali diversi repertori molecolari sono utilizzati nell'infezione di specie animali differenti? Esempi importanti del diverso grado di adattamento all'ospite in *S. enterica* sono il serovar Typhimurium, frequentemente associato con un gran numero di specie animali, e il serovar Abortusovis, isolato unicamente negli ovini. I nostri studi sono basati sull'analisi comparativa di loci genici di virulenza in serovar Abortusovis e serovar Typhimurium e sulla definizione di nuovi caratteri di patogenicità acquisiti da ibridi genomici Abortusovis-Typhimurium. I dati ottenuti dimostrano che i due serovars sono omogenei rispetto alle isole di patogenicità SPI1-5, al locus plasmidico *spv*, ai substrati dei rispettivi sistemi di secrezione di tipo III (SipA, SopA, SopB, SopB, SopD, SopE2) coinvolti nell'induzione dell'enterite in Typhimurium. Viceversa, abbiamo osservato notevoli differenze nello stato di lisogenia per distinti fagi di virulenza e, inoltre, nell'assortimento di geni di virulenza acquisiti orizzontalmente. Infine, i determinanti di patogenicità associati a tali fagi appaiono integrati con i sistemi coordinati di regolazione dell'espressione dei geni di virulenza 'cromosomali' nei diversi stadi dell'infezione.

EZIOLOGIA E ANTIBIOTICO-RESISTENZA DELLE INFEZIONI URINARIE IN PEDIATRIA

Giovanna Blandino, Annamaria Speciale

Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche – Sezione di Microbiologia – Università degli Studi di Catania

Il problema dell'infezione del tratto urinario abbraccia tutti i gruppi di età cominciando dai neonati. L'incidenza dell'infezione urinaria nei bambini fino ai 6 mesi è più comune nei maschi, mentre, durante gli anni prescolari è, invece, più frequente nelle bambine. Nei bambini senza alterazioni anatomiche delle vie urinarie, circa l'80% delle infezioni urinarie è causato da *E. coli* uropatogeni, il restante 20% è dovuto a *Klebsiella*, *P. mirabilis*, *Staphylococcus* sp, enterococchi, così come viene riscontrato nell'adulto. *E. coli* è il più frequente microrganismo infettante anche nelle infezioni ricorrenti e in quelle complicate: in queste infezioni aumenta, però, la relativa frequenza di altri Gram-negativi, enterobatteri e stafilococchi.

Nella patogenesi delle infezioni urinarie concorrono fattori dell'ospite (sesso, età) e fattori legati ai batteri. Importanti fattori di virulenza sono: un'umentata adesività alle cellule uroepiteliali, la capsula polisaccaridica; inoltre, in *E. coli*, produzione di emolisina, il sequestro di ferro mediato dall'aerobactina. Tali fattori di virulenza frequentemente non sono dimostrati nei ceppi di *E. coli* isolati nelle infezioni complicate.

Essendo *E. coli* il principale responsabile delle infezioni urinarie in pediatria è possibile intervenire con una terapia empirica-razionata che tenga conto della prevalenza locale di antibiotico-resistenza. Studi multicentrici italiani mostrano per *E. coli* alte percentuali di resistenza ad ampicillina/amoxicillina (35-55%) e cotrimossazolo (20%); basse percentuali di resistenza vengono invece registrate per amoxicillina in associazione ad acido clavulanico (4,5-7%).

ATTIVITÀ *IN VITRO* DEL VORICONAZOLO SU LIEVITI E FUNGHI FILAMENTOSI: RISULTATI PRELIMINARI DEL PROGETTO G.I.S.I.A. – 2

Giulia Morace^o, Luciano Polonelli* e gruppo GISIA[^]

^oIstituto di Microbiologia, Università degli Studi di Milano, *Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma, ^Gruppo Italiano per lo Studio *In vitro* degli Antifungini.

L'attività *in vitro* del voriconazolo è stata valutata nei confronti di funghi lievitriformi e filamentosi di fresco isolamento clinico in uno studio policentrico, che coinvolge 20 laboratori indipendenti di microbiologia sparsi uniformemente sul territorio italiano (Nord, Centro, Sud ed Isole). I saggi di sensibilità *in vitro* al voriconazolo per i lieviti sono stati effettuati con la metodica di riferimento (micrometodo di diluizione in brodo NCCLS M27-A) e due metodiche sperimentali di diffusione in agar (E-test e disco). Per i funghi filamentosi sono state utilizzate la metodica di riferimento (micrometodo di diluizione in brodo NCCLS M38-P) e una sperimentale di diluizione in brodo (Sensititre). Inoltre, l'attività del voriconazolo nei confronti dei funghi filamentosi è stata comparata a quella dell'amfotericina B e dell'itraconazolo. I risultati, riportati su apposite schede inviate per posta elettronica ad una unità di statistica, sono stati raccolti in un archivio dati ed elaborati. I dati preliminari consentono di affermare che il voriconazolo presenta nei confronti dei lieviti una elevata attività fungistatica a basse concentrazioni (MIC₅₀ 0,03 µg/ml e MIC₉₀ 1 µg/ml con il metodo NCCLS) e che i risultati ottenuti con E-test e disco sono complessivamente omogenei con quelli rilevati con il metodo di riferimento. Il voriconazolo è risultato ugualmente attivo nei confronti dei funghi filamentosi (MIC₅₀ 0,5 µg/ml e MIC₉₀ 1 µg/ml con il metodo NCCLS) presentando anche attività fungicida contro *Aspergillus* spp. I risultati comparativi ottenuti *in vitro* suggeriscono, inoltre, che il voriconazolo potrebbe essere considerato un farmaco alternativo ad amfotericina B e itraconazolo per il trattamento terapeutico di infezioni aspergillari.

Gruppo GISIA: Ancona (E Manso, C Paladini), Bari (MT Montagna, D Tatò), Bergamo (A Goglio, C Farina), Bologna (A Nanetti, S Morelli), Cagliari (M Sanna, R Podda, PP Porcu), Catania (S Oliveri, G Buscema), Firenze (PL Nicoletti, P Pecile), Genova (GC Schito, O Soro), Milano 1 (G Morace, M Drago, MM Scaltrito), Milano 2 (MA Viviani, AM Tortorano), Napoli 1 (G Amato, MM Piccirillo), Napoli 2 (P Cione, S Cucurullo), Novara (S Andreoni, MR Fanello), Palermo (M Menozzi, E Di Stefano), Parma (L Polonelli, S Conti, F Fanti), Pavia (P Marone, C Cavanna), Perugia (F Bistoni, L Pitzurra, A Mencacci), Reggio Calabria (D Sergi, P Barbaro), Roma (G Fadda, M Sanguinetti), Treviso (R Rigoli, M Niero), Varese (GL Lombardi, A Coli), Verona (R Fontana, G Lo Cascio).

UNA NUOVA ZONOSI: IL CANILE

Giovanni Poglayen

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria

Università di Messina

Il percorso storico, inteso come sequenza di eventi fra loro concatenati a rappresentare un algoritmo permette di comprendere e di spiegare il titolo di questa dissertazione, volutamente provocatorio. Ricostruire la nascita del pensiero animalista, l'evoluzione del rapporto uomo / animale, lo sviluppo del concetto di zoonosi ed il paradigma "canile" fornisce l'origine di uno dei problemi più acuti proposti dall'Igiene urbana veterinaria alla attuale società: il canile. A dimostrare l'importanza dell'argomento ormai non vi è più giorno in cui i mass media non si interessino della cosa presentandola ovviamente sotto il profilo loro più congeniale (scoop) ed allontanandone la soluzione. In tutto ciò una grossa responsabilità deve essere attribuita alla classe veterinaria, quella pubblica che non riesce a scrollarsi del concetto di professione zoiatrica e quella privata che tende a favorire atteggiamenti di zoomania con evidenti finalità di lucro. La razionalità lascia il posto ad una terribile confusione dei ruoli. Tutti possono ormai parlare di benessere animale dimenticando che un solo curriculum di studi permette, da sempre, di possedere specifiche competenze in materia, quello previsto dalla Laurea in Medicina Veterinaria. Ma i nuovi profeti senza retroterra culturale imperversano, le fila degli adepti si ingrossano, le soluzioni proposte si fanno vieppiù fantasiose. Scopo di questa dissertazione è proprio quello di riportare la discussione nell'alveo della professionalità, della razionalità, senza tralasciare quegli aspetti di mutata sensibilità del pubblico nei confronti degli animali che caratterizzano l'alba del terzo millennio.

UTILIZZO DEI CARBAPENEMICI NELLA TERAPIA DELLE INFEZIONI INTRADDOMINALI

Franco Paradisi, Giampaolo Corti, Beatrice Borchi, Elisabetta Grilli

Clinica Malattie Infettive, Università degli Studi di Firenze

Le infezioni intraddominali rappresentano un importante problema sanitario sia in ambito domiciliare (appendicite complicata, colangio-colecistite, diverticolite, peritonite, PID complicata) che nosocomiale (infezione conseguente ad intervento di chirurgia generale addominale, biliare od ostetrico-ginecologica). Da un punto di vista microbiologico esse costituiscono un tipico esempio d'infezione mista, potendosi essere in giuoco sia patogeni aerobi che anaerobi, gram-negativi (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* sp.) e gram-positivi (enterococchi, peptococchi, peptostreptococchi, clostridi). Dovendo adottare una strategia terapeutica, almeno inizialmente quando non siano ancora noti i risultati delle indagini microbiologiche effettuate, si impone la scelta tra una *de-escalation therapy* (terapia ad ampio spettro con eventuale successivo restringimento dello stesso secondo il principio dello *step-down*) ed una *escalation therapy* (terapia a spettro ristretto con eventuale successivo ampliamento dello stesso in caso di fallimento clinico): la prima comporta i vantaggi di richiedere un minor numero di modifiche per la presenza di stipti resistenti o per una scarsa risposta clinica, la seconda una minor pressione selettiva ed un minor costo. Tra le molecole idonee all'effettuazione di una *de-escalation-therapy* vanno annoverati i carbapenemici meropenem ed imipenem, gli antibiotici dotati dello spettro più ampio in assoluto (dal quale sono esclusi solamente stafilococchi meticillino-resistenti, *Enterococcus faecium* e *Stenotrophomonas maltophilia*) e dell'attività maggiore nei confronti di bacilli aerobi gram-negativi multiresistenti (*Enterobacteriaceae* produttrici di beta-lattamasi a spettro espanso, *P.aeruginosa*, *Acinetobacter* sp.), come evidenziato anche da recentissimi studi multicentrici internazionali. L'esperienza maturata nel corso di numerosi trial clinici comparativi condotti nell'ultimo decennio su pazienti con infezioni intraddominali ha confermato l'elevata efficacia clinica (80-100%) e microbiologica (70-100%) e la maneggevolezza (assenza di importanti reazioni avverse se si esclude il rischio di convulsioni associato all'impiego di imipenem) dei carbapenemici in monoterapia in questo campo rispetto al tradizionale trattamento d'associazione beta-lattamina (od aminoglicoside) + antianaerobio.

LA PRODUZIONE INDUSTRIALE DI PROBIOTICI: PROBLEMATICHE TECNICO-SCIENTIFICHE E PROSPETTIVE DI SVILUPPO

G. P. Strozzi

Direttore Ricerca e Sviluppo Gruppo MOFIN ALCE - Novara

La conoscenza delle complesse interazioni che intervengono tra il microbiota autoctono dell'ospite ed i microrganismi probiotici alloctoni ingeriti è ancora insufficiente, ma risulta del tutto evidente che effetti benefici sulla salute si manifestano solamente a patto che vengano assunte, per un periodo di tempo minimale, quantità adeguate di cellule vitali e funzionali.

Le società produttrici di probiotici devono pertanto applicare rigidi criteri di selezione dei ceppi da avviare alla produzione industriale, identificando quelli caratterizzati da assoluta bio-sicurezza, dotati di reali *performance* probiotiche, geneticamente stabili e con buona tolleranza al succo gastrico ed alle secrezioni pancreatiche e biliare. Il processo tecnologico di produzione deve inoltre garantire colture ad elevata carica in cellule attive, vitali e stabili fino alla scadenza commerciale e con un grado di purezza batteriologico adeguato all'uso alimentare.

Non tutti i probiotici disponibili attualmente soddisfano i requisiti citati e si rende quindi necessario implementare il livello qualitativo per non disilludere il desiderio dei consumatori di utilizzare metodi naturali per il mantenimento od il miglioramento dello stato di benessere.

E' necessario approfondire la fisiologia dei batteri che, con quattro miliardi di anni di esperienza alle spalle, sono gli organismi viventi che hanno perfezionato al meglio l'arte della riproduzione e la capacità di modulare il proprio metabolismo in funzione delle condizioni colturali.

Nell'apparente semplicità della scissione binaria, che consente ad una cellula madre di dividersi in due cellule figlie, sono in realtà insiti meccanismi molto complessi, in gran parte ancora sconosciuti, che solamente la biologia molecolare, attraverso lo studio della regolazione globale dell'espressione genica, potrà permettere di comprendere.

L'evoluzione scientifica in atto consentirà di chiarire fenomeni come la sincronizzazione della divisione cellulare, la sintesi degli acidi nucleici e dei *patterns* enzimatici in funzione del *medium* e delle condizioni colturali e permetterà di far luce sui vari meccanismi di difesa (secrezioni di *biofilms* e sporulazione), di autoregolazione numerica (apoptosi) e di modificazione della composizione della membrana da cui dipende la permeabilità cellulare.

Queste ricerche avranno ripercussioni positive sulla tecnologia di produzione (fermentazione, crioprotezione e disidratazione) consentendo di ottenere cellule più resistenti agli *stress*, naturalmente più stabili e tolleranti al transito gastro-duodenale.

LA MICROBIOLOGIA E L'IMMUNOLOGIA NELLO STUDIO DEL PAZIENTE PARODONTALE

Claudio Passariello

Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, Università degli Studi di Roma "La Sapienza".

Con il termine "malattia parodontale" si indicano distinti quadri patologici, caratterizzati dal progressivo danneggiamento delle componenti tissutali del legamento parodontale, che conduce più o meno lentamente alla completa perdita del tessuto di supporto dei denti ed alla loro conseguente perdita.

In considerazione dell'elevata diffusione di questi quadri patologici nella popolazione, del fatto che sono stati riscontrati anche nelle fasce di età più giovani, inclusi i bambini, e poiché la perdita dei denti deve essere considerato un grave problema sociale ed un notevole aggravio per la spesa sanitaria, unitamente al fatto che più di recente si è evidenziata la correlazione fra queste patologie ed altre gravi patologie sistemiche, lo studio della malattia parodontale, sia a livello etiologico che patogenetico è da lungo tempo considerato di notevole importanza.

Moltissimi sforzi di ricerca sono stati compiuti per comprendere a fondo il coinvolgimento delle diverse specie batteriche presenti a livello parodontale nel determinismo delle lesioni, ed ancor più per chiarire i rapporti fra questi microorganismi e le diverse componenti del sistema difensivo dell'ospite.

Allo stato attuale sono state individuate diverse specie batteriche che possono essere considerate patogene a livello parodontale, e che sono coinvolte in una o più delle forme cliniche dianzi ricordate; di alcuni dei più importanti fra questi microorganismi sono stati studiati, in modo anche dettagliato, i meccanismi di virulenza più evidenti e più probabilmente coinvolti nella patogenesi della malattia parodontale. E' altresì emerso che non tutti i ceppi di una medesima specie esprimono tali fattori di virulenza nello stesso modo e che quindi si deve tenere in considerazione l'ipotesi di una patologia ceppo specifica. Sulla base di tali dati sono stati messi a punto diversi approcci diagnostici, per lo più di tipo molecolare, per la ricerca nei campioni clinici di determinati microorganismi parodontopatogeni, sebbene la loro applicabilità alla routine diagnostica e la loro utilità siano ancora da valutare.

Un discorso simile vale per l'aspetto immunologico della malattia parodontale, considerato che si cominciano a comprendere numerosi aspetti delle alterazioni del sistema immunitario e dell'omeostasi tissutale in corso di malattia parodontale, e negli ultimi tempi si stanno sviluppando approcci che possano sfruttare tali conoscenze per la diagnosi ed il trattamento di tale malattia (sistemi EIA, farmaci immunomodulanti ecc.).

BIFIDOBATTERI: ECOLOGIA, PROBIOTICA E PREBIOTICA.

Bruno Biavati

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-ambientali

Università degli Studi di Bologna, Bologna, ITALY

Il numero di microrganismi varia nei diversi tratti dell'apparato digerente raggiungendo nel colon valori di 10^9 - 10^{11} unità formanti colonie (CFU) per grammo di contenuto.

I bifidobatteri rappresentano un importante componente del microbiota intestinale sia dal punto di vista numerico che funzionale. Studi da noi condotti sull'ecologia dei bifidobatteri hanno permesso di stabilire che tali microrganismi colonizzano tipicamente l'apparato digerente umano ed animale. Nell'intestino uomo alcune delle specie presenti sono tipiche, cioè si ritrovano unicamente nel neonato, altre si ritrovano unicamente nell'adulto, altre ancora sono presenti durante tutto il ciclo della vita, inoltre i bifidobatteri sono presenti nella vagina e nella cavità orale. Negli animali gli studi riguardano prevalentemente l'apparato digerente di quelli domestici con la presenza di specie tipiche di un certo animale ed altre invece comuni a più animali. Nel solo caso dei vitelli, prima che si sviluppi il rumine, sono state isolate specie tipiche dell'intestino umano.

Numerosi studi hanno dimostrato l'effetto benefico o terapeutico sull'ospite da parte di alcuni microrganismi che sono stati per questo definiti probiotici. Tali proprietà dipendono dalle interazioni fra i componenti del microbiota intestinale e tra questi e l'ospite. Recenti studi da noi condotti hanno fornito interessanti risultati sulle proprietà di colonizzazione di ceppi di bifidobatteri probiotici.

Alla probiotica si è affiancata un'ulteriore disciplina denominata prebiotica che prevede l'impiego di oligosaccaridi e polisaccaridi complessi che promuovono selettivamente la crescita di una o di un limitato numero di specie batteriche nel colon. I prebiotici devono possedere particolari caratteristiche: a) non devono essere idrolizzati e quindi assorbiti nella zona gastrica o nella prima parte dell'intestino b) devono rappresentare un substrato utilizzabile da pochi ceppi, quasi esclusivamente bifidobatteri, in modo da consentirne il loro arricchimento.

IL RUOLO DELLE COLLEZIONI DI COLTURE COME SUPPORTO ALLA RICERCA BIOTECNOLOGICA

A. Vaughan, P. Buzzini & A. Martini

Dip. Biologia Vegetale e Biotecnologie Agroambientali –

Sez. Microbiologia Applicata & Collezione dei Lieviti Industriali DBVPG

<http://www.agr.unipg.it/dbvpg/>

Borgo XX Giugno – 06121 Perugia

La ricerca di molecole bioattive provenienti da microrganismi si basa su selezioni massali specifiche effettuate su un numero molto elevato di colture microbiche (high-throughput screenings) per mettere in evidenza ceppi capaci di sintetizzare composti naturali (natural product-based drug discovery), la cui produttività verrà successivamente migliorata attraverso la microbiologia applicata. Anche se molte compagnie biotecnologiche effettuano campagne di isolamento di microrganismi da ambienti naturali per costituire per conto proprio la biodiversità per le loro selezioni massali, la maggior parte si rivolge a centri specializzati [collezioni microbiche o centri di risorse biologiche (BRCs)] che sono in grado di fornire ceppi affidabili e di alta qualità. Inoltre, non va dimenticato che nei BRCs lavora personale altamente specializzato, in grado non solo di identificare microrganismi, ma anche di offrire servizi di mantenimento dei ceppi raccolti e di screening per conto terzi.

Il mantenimento di centri BRCs specialistici è in linea con una recente convenzione internazionale (The Convention of Biological Diversity) stipulata per salvaguardare i patrimoni genetici locali in vista di una eccessiva globalizzazione che potrebbe minacciare la scomparsa di habitats locali tipici o portare a sfruttamenti indebiti di risorse biologiche dei paesi in via di sviluppo. Sono, di conseguenza, sorte diverse organizzazioni nazionali ed internazionali volte a coordinare e salvaguardare questi preziosi depositari della biodiversità genetica.

Ciò nonostante, il fatto che l'Italia rimanga ancora l'unico paese europeo senza una coordinazione centralizzata per i suoi BRCs, crea un'emergenza nazionale che mette in grave pericolo la sopravvivenza delle collezioni nazionali e che risulta in una perdita netta di potenziale valore aggiunto per la biotecnologia italiana. Una associazione tra piccole e medie collezioni in una organizzazione centrale (Federazione Italiana di Collezioni di Colture Microbiche (FICCM) che assicuri una stretta sinergia operativa (da pubblicizzare attraverso un database, un catalogo ed un sito Internet comune) potrebbe ovviare a questo inconveniente.

ERTAPENEM: PROFILO MICROBIOLOGICO

A. Marchese*, L. Gualco, E. Tonoli, G.C. Schito

Sezione di Microbiologia C.A. Romanzi, Università degli Studi di Genova

Ertapenem è un nuovo carbapenemico parenterale caratterizzato da una lunga emivita (4.5 ore) che ne permette un'unica somministrazione giornaliera. Come meropenem, ertapenem non è idrolizzato dalla deidropeptidasi-1 renale umana e non richiede pertanto l'associazione con cilastatina. Questo nuovo carbapenemico ha effetto battericida legandosi preferenzialmente alle PBP2 e 3.

Ertapenem è stabile all'idrolisi da parte di diversi tipi di b-lattamasi incluse penicillinasi, cefalosporinasi e b-lattamasi a spettro esteso (ESBL). Analogamente ad altri carbapenemici è sensibile alle metallo-b-lattamasi. I principali patogeni inclusi nello spettro di ertapenem sono: stafilococchi meticillino-sensibili, *Streptococcus pneumoniae*, *S.pyogenes*, *S.agalactiae*, alcune specie di *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus influenzae*, *M.catarhalis*, *Bacteroides* spp. e *Peptostreptococcus* spp.

Un recente studio condotto presso il nostro Laboratorio ha valutato l'attività *in vitro* del nuovo carbapenemico nei confronti di 550 patogeni respiratori di recente isolamento in paragone con altri antibiotici selezionati utilizzando la metodica della microdiluzione in brodo (NCCLS, 2002). Analizzando i dati, tenendo conto dei breakpoint disponibili, ertapenem è risultato attivo sul 100% dei ceppi di: *S.pneumoniae* penicillino-sensibile (100 stipiti) ed -intermedio (50), *S.pyogenes* eritromicino-sensibile (40) e -resistente (60), *H.influenzae* (70) e *M.catarhalis* (70) indipendentemente dalla produzione di b-lattamasi, *S.aureus* meticillino-sensibile (100) e *K.pneumoniae* inclusi ceppi produttori di ESBL (30). Nei confronti di *S.pneumoniae* penicillino-resistente (30) ha dimostrato attività superiore (60% di ceppi sensibili) ad imipenem (20%) e paragonabile a quella di amoxicillina (63%). Questi risultati confermano una buona attività *in vitro* di ertapenem e suggeriscono, anche per la nostra realtà geografica, un ruolo terapeutico del nuovo carbapenemico nel trattamento delle infezioni respiratorie comunitarie.

INFEZIONI URINARIE COMUNITARIE. EPIDEMIOLOGIA DELLE RESISTENZE: UN'ESPERIENZA ITALIANA ED UNA VISIONE INTERNAZIONALE

A. Marchese*, Dolcino M. e Schito G.C.

Sezione di Microbiologia C.A. Romanzi, Università degli Studi di Genova

L'incidenza di resistenza in *E.coli*, principale agente eziologico di infezioni urinarie comunitarie, a molecole quali trimetoprim e ampicillina che trovano largo uso per il trattamento di queste affezioni, ha superato in diversi paesi il 30-50% eliminando di fatto in quelle regioni l'impiego clinico di questi farmaci considerati generalmente di prima scelta. Anche un utilizzo esteso dei fluorochinoloni, molecole caratterizzate da grande attività nei confronti dei germi gram-negativi, in alcune aree geografiche, ha provocato lo sviluppo e la diffusione di ceppi di *E.coli* resistenti. Una recente indagine epidemiologica svolta nel nostro Laboratorio ha valutato la sensibilità in vitro, secondo la metodica dell'agar-diluizione (NCCLS, 2002), di 445 germi gram-negativi isolati da urine di pazienti ambulatoriali nei confronti di antibiotici comunemente inclusi nel trattamento delle infezioni urinarie: amoxicillina/clavulanato, ciprofloxacina, cotrimossazolo, fosfomicina, nitrofurantoina e norfloxacina.

Come atteso, *E.coli* è stato il principale microorganismo isolato ed in particolare questo germe ha rappresentato l'86.9% di tutti gli stipti studiati seguito da *P.mirabilis* (5.4%). Fosfomicina è risultata la molecola più attiva nei confronti di *E.coli* (99% di ceppi sensibili). Anche nitrofurantoina ha dimostrato buona attività verso questo patogeno (97%). L'11% dei ceppi di *E.coli* è risultato resistente all'associazione amoxicillina/clavulanato. Per quanto concerne la refrattarietà a norfloxacina e ciprofloxacina questa si attestava al 15 e 12% rispettivamente. Cotrimossazolo è risultata la molecola meno attiva con il 24% di stipti resistenti. Nei confronti di *P.mirabilis* fosfomicina ha manifestato attività superiore (87.5% di ceppi sensibili) a cotrimossazolo (67%) e nitrofurantoina (nessun ceppo sensibile). Tutti gli isolati di questa specie erano sensibili ad amoxicillina/clavulanato, mentre la prevalenza di refrattarietà a ciprofloxacina e norfloxacina si collocava al 4 e 8%.

In conclusione, da questi dati emerge che nei confronti di *E.coli*, il patogeno dominante nelle infezioni urinarie comunitarie, fosfomicina rappresenta la molecola con la più bassa percentuale di ceppi resistenti, in accordo con quanto osservato anche in altre realtà geografiche.

METODOLOGIA DI ANALISI MOLECOLARE NELLE PATOLOGIE DA ESPANSIONE DI TRIPLETTE : DIAGNOSI MOLECOLARE DI SINDROME DELL'X FRAGILE.

M. Grasso

Laboratorio di Genetica Umana – Ospedale Galliera – Genova

Il termine mutazione dinamica è stato introdotto nel 1991 per definire le mutazioni causate da espansioni di triplette e caratterizzate da un'elevata instabilità sia somatica che meiotica.

La Sindrome dell'X Fragile è la prima malattia genetica ad essere stata associata ad una mutazione dinamica. A tutt'oggi si conoscono 14 malattie genetiche neurologiche che hanno come base molecolare l'espansione di una tripletta.

La Sindrome dell'X Fragile è una condizione patologica associata a ritardo mentale X linked, causata dall'espansione della tripletta CGG nella regione 5' UTR del gene FMR1. La sequenza ripetuta CGG è polimorfica nella popolazione generale con un numero variabile da 6 a 55 CGG. Quando la sequenza ripetuta CGG supera le 200 copie si associa all'ipermetilazione delle isole CpG del promotore del gene FMR1 (mutazione completa) oltre che della sequenza ripetuta stessa. L'ipermetilazione ha come conseguenza l'inattivazione del gene FMR1 e il fenotipo patologico è associato quindi all'assenza della proteina FMRP. Un numero intermedio di triplette compreso tra 56 e 200 (premutazione) non si associa a ipermetilazione. I portatori sono clinicamente normali, ma la premutazione è instabile e si può espandere durante la trasmissione alle generazioni successive soprattutto se per via materna.

Nella sindrome dell'X Fragile è molto frequente il riscontro di casi a mosaico che possono essere mosaici di lunghezza della sequenza ripetuta CGG, ma anche mosaici di metilazione.

Da tutto ciò ne consegue che nell'analisi molecolare della mutazione FRAXA va posta particolare attenzione sia nella valutazione dell'espansione CGG che dello stato di metilazione del promotore del gene FMR1.

Negli anni le indagini di laboratorio finalizzate alla diagnosi della sindrome dell'X Fragile si sono modificate; in particolare dal '91, con la scoperta del gene FMR1 e della mutazione, l'induzione citogenetica del sito fragile Xq27.3 è stata sostituita dall'analisi molecolare su DNA, più sensibile e specifica, che si avvale essenzialmente delle tecniche Southern blot e PCR.

Verranno esposti nel dettaglio specificità e limiti dei diversi metodi d'indagine molecolare applicati alla diagnosi della sindrome dell'X Fragile.

STRATEGIA CHIRURGICA DELLE INFEZIONI INTRAADDOMINALI GRAVI

Gabriele Sganga

Istituto Clinica Chirurgica, Università Cattolica del S.Cuore - Roma

La mortalità della peritonite rimane molto variabile, tra lo 0% ed il 70%. Questa variabilità dipende da vari fattori tra cui l'età, l'organo di partenza della peritonite, la sua comparsa come patologia spontanea o come complicanza post-operatoria o post-traumatica, le malattie associate. Pur riconoscendo validità alle terapie intensivologiche di supporto per contrastare l'azione di batteri e tossine o per far fronte alle alterazioni bioumorali scatenate dai mediatori, non vi è dubbio che la più efficace terapia etiologica della sepsi addominale è rappresentata da chirurgia e antibiotici.

In questi ultimi anni non sono mancati **contributi innovativi nella chirurgia** che coadiuvata da più sofisticati mezzi diagnostici e di monitoraggio si afferma come terapia primaria ed indispensabile nella trattamento delle sepsi intraaddominali, diventando sempre più estensiva e aggressiva nei confronti della noxa patogena. La chirurgia è importante nelle infezioni intraaddominali non solo nel trattamento precoce, ma non esita a considerarsi prioritaria in caso di insuccesso e/o mancato controllo della sepsi anche nei pazienti critici in Multiple Organ Failure. Il riconoscimento della **sindrome compartimentale addominale** e cioè l'aver individuato che alterazioni respiratorie, emodinamiche, renali, cerebrali possono dipendere dall'aumento della pressione endoaddominale, ha portato a richiedere una laparotomia esplorativa e decompressiva.

Nell'ambito delle diverse strategie chirurgiche vanno considerate diverse metodiche, e assai spesso si rende necessario adottarne più di una per poter dominare ed eradicare il focolaio settico. In presenza di un focolaio suscettibile di aggressione e/o rimozione chirurgica l'intervento va eseguito, il più precocemente possibile. Spesso esso è motivato non solo dall'obiettivo di rimuovere il focolaio, ma anche dalla necessità di riparare, correggere, arrestare la fonte della contaminazione microbica.

Per quanto riguarda la condotta chirurgica, essa deve seguire alcune regole fondamentali:

- * Accesso chirurgico sufficientemente ampio per consentire un'adeguata esplorazione della cavità peritoneale;
- * Rimozione dei visceri responsabili della sepsi (appendicectomia, colecistectomia, resezione del colon, ecc.), oppure loro riparazione (rafia di ulcera perforata) o ancora loro esclusione funzionale (esteriorizzazione, enterostomia a monte);
- * Toilette accurata del focolaio settico, comprendente il drenaggio delle raccolte ascessuali, la rimozione dei tessuti necrotici e la esecuzione di abbondanti lavaggi della cavità peritoneale;
- * Posizionamento di adeguati tubi di drenaggio.
- * Trattamento aperto (marsupializzazione, laparostomia), nei casi di gravi ascessualizzazioni multiloculate in cui si prevede una recidiva della patologia settica (ascessi pancreatici multipli, gravi peritoniti diffuse con ascessualizzazioni multiple).

I MECCANISMI DI RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI NEI BATTERI GRAM POSITIVI

Stefania Stefani

Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Ginecologiche – Università degli Studi di Catania

Il diffuso e, a volte, non controllato utilizzo degli antibiotici per uso umano ed animale, ha incoraggiato lo sviluppo delle resistenze in una varietà di batteri patogeni e non.

Le specie Gram positive utilizzano diversi meccanismi di resistenza che includono tra gli altri la modificazione della struttura dell'antibiotico, la mutagenesi di aminoacidi chiave nel target molecolare di alcuni antibiotici o l'efflusso. Questi tre meccanismi sono stati identificati in profili di resistenza coinvolgenti sistemi quali la sintesi proteica, la replicazione degli acidi nucleici e la formazione della parete cellulare.

Oggi l'emergenza di ceppi batterici, che mostrano resistenza ad uno più antibiotici (ceppi multiresistenti), è la causa maggiore dei fallimenti terapeutici in infezioni molto diffuse.

Per capire come impedire l'acquisizione di nuove resistenze o la diffusione di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti, di *Streptococcus pneumoniae* resistente alla penicillina, ai macrolidi e ai chinoloni, e di Enterococchi resistenti agli aminoglicosidi e ai glicopeptidi, è importante studiare ed analizzare gli eleganti meccanismi acquisiti da questi microrganismi in un periodo di tempo relativamente breve come quello definito "era antibiotica".

L'USO DEGLI ANTIBIOTICI È L'UNICA CAUSA DI SELEZIONE DI RESISTENZE? PROBLEMI DI RESISTENZA NEI GRAM-POSITIVI

Annalisa Pantosti

Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'uso di antibiotici rappresenta una forza selettiva potente per l'insorgenza di ceppi batterici resistenti. La relazione tra trattamento antibiotico e resistenza non è però sempre diretta, come nel caso del micobatterio tubercolare, in cui la resistenza ai principali farmaci è mediata da mutazioni puntiformi, per cui un trattamento lungo ed inadeguato può portare all'emergenza di sottopopolazioni resistenti nel paziente sotto trattamento. In molti microorganismi di importanza clinica (es. *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp, solo per citare i gram-positivi), il rapporto tra terapia e resistenza è meno diretto. In questi patogeni la resistenza agli antibiotici è dovuta più spesso al trasferimento orizzontale di geni di resistenza "pre-fabbricati", o ad un complesso accumularsi di processi di ricombinazione e mutazione, che difficilmente si possono realizzare durante un intervento terapeutico. E' piuttosto l'uso di antibiotici nella popolazione generale o in un determinato ambiente (ospedale, allevamento zootecnico) che condiziona lo sviluppo di resistenza, modificando l'ecologia microbica soprattutto a livello della flora normale, riducendo il numero dei batteri sensibili e favorendo la sopravvivenza e la diffusione dei microrganismi resistenti. Pertanto, nella comunità circoleranno più batteri resistenti, ed aumenterà la probabilità che un soggetto sia colonizzato e/o si ammali per un'infezione da batteri resistenti. A supporto di questa ipotesi saranno presentati due studi condotti in Italia. Nel primo studio sono stati considerati i dati di resistenza di ceppi invasivi di *S. pneumoniae* isolati in diverse aree del paese, e i dati di consumo di antibiotici raccolti dal Ministero della Salute nel 2000. Si è osservata una correlazione significativa tra la frequenza di resistenza a beta-lattamici e macrolidi in *S. pneumoniae* e il consumo di queste classi di antibiotici nelle varie regioni Italiane, con un trend geografico Nord-Sud. Il secondo studio è stato condotto in un ambito diverso, quello degli allevamenti zootecnici, ed ha dimostrato una correlazione tra la sospensione dell'uso di avoparcina, un analogo della vancomicina utilizzato come promotore di crescita, e la diminuzione dei ceppi di *Enterococcus* spp. resistenti ai glicopeptidi nelle carni di origine animale.

L'uso di antibiotici non è certamente l'unico fattore tra quelli che concorrono alla determinazione del fenomeno antibiotico-resistenza. Esso è però uno dei pochi su cui si possa intervenire efficacemente, riducendo ogni uso non appropriato.

DAI TLRs ALLE RISPOSTE TH: NUOVE FRONTIERE NELLE RISPOSTE IMMUNI, ALLERGICHE ED AUTOIMMUNI AI PARASSITI

Luigina Romani

Microbiologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università di Perugia, 06122 Perugia

La risposta immune ai microbi riposa sull'interazione reciproca tra immunità innata e quella adattativa specifica. L'immunità adattativa è mediata dai linfociti T e B che presentano recettori di riconoscimento dell'antigene distribuiti in maniera clonale. Responsabile della immunità adattativa sono i diversi "subsets" di cellule Th e la conseguente produzione di citochine effettrici da parte di queste. Le cellule Th "naive", se stimolate con antigeni presentati da cellule presentanti l'antigene (APCs), si differenziano in diversi "subsets" Th. Linfociti Th1, attraverso la produzione di interferone- γ (IFN- γ), promuovono principalmente un'immunità di tipo cellulare diretta contro patogeni intracellulari, cellule Th2, producendo interleuchina 4 (IL-4), IL-5 e IL-13, promuovono soprattutto un'immunità di tipo umorale coinvolta nel controllo di patogeni a sede extracellulare mentre linfociti T regolatori (Treg) regolano l'attività di entrambi queste popolazioni, attraverso diversi modalità, inclusa la produzione di IL-10 e di TGF- β . L'ambiente citochinico, in questa fase, è coinvolto in modo critico, essendo, ad esempio, IL-12, in grado di guidare la differenziazione in senso Th1 ed IL-4 in senso Th2, sebbene altre citochine "istruttive" partecipino al processo di polarizzazione Th. L'equilibrio tra i diversi "subsets" Th, nonché l'attività di cellule Treg, determina anche l'inizio e l'esito di un'ampia varietà di disturbi immunitari associati alle infezioni, incluse le malattie autoimmuni e quelle allergiche, talché una opportuna manipolazione di tali risposte può essere di beneficio terapeutico nelle infezioni e nelle patologie associate.

Considerata inizialmente una risposta immediata e non specifica, caratterizzata dalla cattura e dall'ingestione di microrganismi e sostanze estranee da parte di fagociti, è ora evidente che l'immunità innata possiede almeno altri due fondamentali caratteristiche, che sono una considerevole specificità, essendo in grado di discriminare tra patogeni diversi e tra questi ed il "self" e la capacità di innesco dell'immunità acquisita. L'attuazione di tali funzioni è resa possibile dalla presenza di una varietà di recettori presenti su cellule della reattività innata ed APCs, denominati PRRs, o "pattern-recognition receptors", capaci di riconoscere motivi strutturali altamente conservati nell'ambito dei patogeni, denominati PAMPs, o "pathogen-associated molecular patterns". Il coinvolgimento di svariati PRRs, ivi inclusi i Toll-like receptors (TLRs), da parte di PAMPs diversi dà luogo a risposte cellulari diverse, che vanno dalla semplice fagocitosi all'innesco della risposta adattativa specifica, tramite la produzione citochinica e l'induzione di molecole di costimolazione. I risultati di studi recenti intrapresi in tale ambito depongono per un ruolo chiave dei diversi PRRs nel condizionare la risposta immune nel suo complesso e forniscono nuove basi conoscitive nell'ambito delle risposte immuni, autoimmuni ed allergiche ai diversi patogeni. Finalizzato dal Progetto AIDS, contratto 50D.27

CONTRIBUTI DEL MODELLO FIV ALLO SVILUPPO DI VACCINI ANTI-AIDS

Mauro Bendinelli, Donatella Matteucci, Mauro Pistello, Simone Giannecchini
Centro Retrovirus, Dipartimento di Patologia Sperimentale, Università di Pisa

Gli ostacoli incontrati nello sviluppo di efficaci vaccini anti-AIDS sono formidabili. Fra i più significativi: l'altissimo grado di diversità genetica ed antigene di HIV, la scarsa disponibilità di epitopi protettivi sulla superficie del virione e delle cellule infettate, la bassa sensibilità del virus all'azione degli anticorpi neutralizzanti e degli altri effettori delle risposte immuni, la rapidità con cui si ha formazione di provirus dopo infezione, la prontezza con cui la quasispecie virale evolve sotto le pressioni selettive più svariate. Anche se è possibile che soluzioni ad alcuni di tali ostacoli emergano empiricamente dai trials clinici con vari immunogeni HIV attualmente in corso o in programma, il lavoro di base su modelli animali resta l'approccio più razionale e sicuro per comprendere i meccanismi in gioco e per individuare e validare possibili contro-strategie. I sistemi animali più utilizzati sono l'infezione del macaco con SIV o SHIV e l'infezione del gatto con FIV. In effetti, il fitto dibattito e la competizione che si sono intrecciati fra i numerosi laboratori coinvolti nello studio di tali modelli hanno contribuito sostanzialmente a far luce su alcuni degli aspetti sopramenzionati. Il modello FIV ha fra i suoi pregi il fatto che rappresenta un'infezione naturale ampiamente diffusa nella popolazione felina e il costo comparativamente basso di gestione. Gli studi effettuati su questo modello dal nostro gruppo hanno, in particolare, contribuito a definire i parametri da rispettare nell'esecuzione degli esperimenti di vaccinazione, a stabilire che una efficace immunità protettiva vaccinale è realmente ottenibile, a chiarire i limiti di tale protezione e a individuare correlati immunologici misurabili in vitro. All'attivo del nostro gruppo c'è anche il primo esperimento di vaccinazione effettuato su animali di campo, con risultati promettenti. Di recente, negli USA è stato approvato un vaccino per uso commerciale, la cui efficacia nelle situazioni di campo resta tuttavia ancora da determinare.

NUOVE BIOTECNOLOGIE AL SERVIZIO DELLA DIAGNOSTICA MOLECOLARE IN VIROLOGIA

Jennifer L. McDermott¹, Isabella Martini¹, Francesca Bertolotti¹, Elisabetta Maioli¹, Elisabetta Tedone³, Andrea Bacigalupo³, Massimo Ulivi⁴, Landt Olfert⁴, Oliviero E. Varnier^{1,2}

Sezione Microbiologia¹, Università di Genova; U.O. Microbiologia Clinica²; Centro Trapianti di Midollo³, Ospedale San Martino, Genova; Tib MolBio⁴, Berlino.

La diagnostica delle infezioni virali deve utilizzare esami non solo sensibili e specifici, ma sempre più quantitativi e rapidi, poiché la prognosi di pazienti con patologie gravi (tumori, immunodeficienze, trapianti, ecc.) concede un tempo ridotto per l'intervento terapeutico. La rendicontazione dell'attività sanitaria richiede anche una valutazione dei costi e privilegia l'automazione. Recentemente nuove biotecnologie con queste caratteristiche sono disponibili: estrazione automatica di acidi nucleici (MagNA Pure) e quantificazione mediante PCR in tempo reale (LightCycler).

La determinazione quantitativa, automatizzata, rapida e a costi ridotti delle infezioni da CMV, EBV e HHV-6 è stata eseguita in pazienti trapiantati di midollo. In **50 giorni** sono stati raccolti **334 campioni di sangue da 69 pazienti TM**. Il plasma è stato separato, aliquotato e congelato a -70°C. Serie di 8 aliquote di 200 µl sono state poste nell'estrattore automatico MagNA Pure LC e l'estrazione di DNA è stata eseguita utilizzando il kit "MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation" (8 campioni in 15 minuti). Di seguito i campioni sono stati distribuiti nei capillari utilizzati per la reazione di Real Time PCR con il kit "LC FastStart DNA Master Hybridization Probes" (LightCycler). La determinazione quantitativa è stata eseguita in circa 50 minuti per ogni virus (max 25 campioni). In parallelo è stata amplificata una serie di calibratori: diluizioni di un plasmide contenente da 10¹ a 10⁷ copie della sequenza bersaglio. La specificità del segnale è stata confermata analizzando le temperature di melting.

Il monitoraggio delle viremie da CMV, EBV e HHV-6 in pazienti TM è stato realizzato in tempi rapidi: oltre 80 campioni sono stati analizzati per CMV con invio del referto via e-mail entro 6 ore, con un tempo minimo di 90 minuti. Sono state fatte **307 estrazioni** e **502 amplificazioni**: 51 campioni sono risultati positivi, rispettivamente 42 per CMV, 8 per EBV e 1 per HHV-6. Dei 69 pazienti, 12 sono risultati CMV positivi, 3 EBV positivi e 1 HHV-6 positivo.

Questi risultati preliminari indicano che il sistema effettua una ottima quantificazione, con una buona riproducibilità, una automazione quasi totale, una elevatissima rapidità, con un rischio quasi nullo di contaminazione ed un costo pari al **35%** di quello dei sistemi convenzionali.

INFEZIONI VIRALI NEI TRAPIANTATI

R Cavallo

Dipartimento di Sanità Pubblica e di Microbiologia, Università di Torino

I poliomavirus umani BK e JC (BKV e JCV) infettano oltre il 60% della popolazione. Dopo l'infezione primaria, entrambi i virus rimangono latenti nel rene e nei linfociti B. Le patologie attribuibili a questi due virus si verificano prevalentemente in situazione di immunodepressione, per la maggior parte in seguito alla riattivazione dell'infezione latente. Diversamente al JCV che possiede neurotropismo, le patologie correlate al BKV sono principalmente confinate al tratto urinario. Le infezioni da BKV e JCV si verificano indipendentemente, ma infezioni concomitanti e persistenza di entrambi i virus sono state osservate in pazienti immunodepressi. In questi pazienti l'escrezione urinaria del BKV aumenta. Nei trapiantati di midollo sono stati descritti casi di cistite emorragica da BKV. Per quanto riguarda i trapiantati renali, essi sono soggetti all'azione di questi due virus, non solo come risultato della loro riattivazione, ma anche perché possono essere introdotti nel ricevente attraverso l'organo trapiantato; è stato infatti riportato che nel 38% dei reni da donatore cadavere sono dimostrabili sequenze genomiche di BKV e JCV. In numerosi studi il BKV è stato correlato con la nefrite interstiziale. L'escrezione del virus nelle urine ha un'incidenza del 5-45% e la replicazione massiva del BKV nell'epitelio tubulare risulta nella perdita dell'organo in circa il 3-5% dei casi. Di recente è stato ipotizzato che alcuni casi di nefropatia possano essere associati al JCV. La PCR qualitativa su urine e sangue del BKV e del JCV è di utilità clinica limitata, in quanto la sola presenza del DNA virale non può essere considerata indice diagnostico. Recentemente sono state sviluppate tecniche per la quantificazione sia del BKV-DNA che del JCV-DNA nei pazienti immunocompromessi. Nel nostro Laboratorio è in corso uno studio per valutare nelle urine e nel siero la carica virale mediante una PCR quantitativa-competitiva. Ci si propone inoltre di valutare l'espressione dei trascritti, del gene precoce per l'antigene large T e del gene tardivo per la proteina capsidica nei linfomonociti circolanti, markers di replicazione virale in atto, mediante una RT-PCR.

La determinazione quantitativa della carica virale dei poliomavirus BK e JC in associazione a quella dei trascritti del ciclo replicativo nelle urine e nei linfomonociti, consentirà di porre diagnosi di infezione attiva: ciò permetterà un efficace monitoraggio dei trapiantati per individuare i soggetti a rischio di patologie d'organo, ed effettuare un appropriato intervento profilattico e/o terapeutico.

IL MEDICO DI MEDICINA GENERALE E LE INFEZIONI RESPIRATORIE CONTRATTE IN COMUNITÀ

Dr. Alessandro Prestifilippo

Medico di MG - Catania

Le infezioni respiratorie, contratte in comunità, rappresentano le infezioni più gravi che il MMG deve affrontare e spesso curare a domicilio del paziente.

Visite mediche per IVR in Italia nell'anno 2000

Numero visite totali 16.475.000 - Numero visite per polmoniti 1.318.000.

Fattori correlati positivamente per mortalità per CAP

Età avanzata •Leucocitosi elevata •Batteriemia (da Streptococcus pneumoniae in 2/3 dei casi) •Estensione radiologica dell'impegno polmonare •Abuso di alcool

•Eziologia da Gram-negativi e da Staphylococcus aureus •Forme post-ostruttive •Forme da aspirazione.
I più Comuni Agenti Eziologici - S.PNEUMONIE, M.CATARRHALIS, H.INFLUENZA E, MYCOP.PNEUMONIE, SEGUITI DA: CLAMYDIA PNEUMONIE, L.PNEUMOPHILA E S.AUREUS; NEI PAZIENTI IMMUNOCOMPROMESSI, DEBILITATI OD ANZIANI SI POSSONO RISCONTRARE SPES- SO P.AERUGINOSA E KLEBSIELLA PNEUMONIE.

VIRUS MICETI

Diagnosi

La radiografia del torace andrà fatta al più presto, compatibilmente con le condizioni logistiche e cliniche del paziente; la sua esecuzione non dovrà in ogni modo condizionare l'inizio della terapia antibiotica.

Esame colturale: difficile, se non d'impossibile esecuzione. Il 75% di questi pazienti è dato da anziani over 65 anni!

I pazienti ANZIANI sono i più colpiti, per cui l'interesse dei Medici di Famiglia deve essere maggiormente e sicuramente rivolto a questa categoria.

Dal punto di vista funzionale oggi, un 65enne è più vicino ad un 50enne, per cui si può parlare di anziano al di sopra dei 70 anni. Quando è possibile, e' comunque preferibile la cura a domicilio.

Non ricoverare un paziente assegnato alle classi di rischio I e II (PORT) permette di ridurre sensibilmente la spesa sanitaria pur garantendo al paziente, sulla base di criteri validati, un approccio terapeutico assolutamente adeguato al quadro clinico.

Nel paziente ambulatoriale è ancora più difficile accedere ai test diagnostici.

L'inizio del trattamento antibiotico non può essere dilazionato.

Terapia

Nella nostra realtà, il trattamento isolato con il solo macrolide non è attualmente da raccomandare.

Il macrolide andrebbe associato ad aminopenicillina ad alte dosi, preferibilmente associata ad un inibitore delle - beta-lattamasi o ad una cefalosporina di 2° generazione.

Il chinolone fluorurato ad attività antipneumococcica può rappresentare una scelta alternativa ed equivalente all'associazione Beta-lattamico + macrolide (polmonite atipica, paziente anziano, con patologie concomitanti, portatori di BPCO, pazienti istituzionalizzati, allergici o intolleranti alla penicillina, ecc.).

RIBOTIPIZZAZIONE AUTOMATICA IN MICROBIOLOGIA CLINICA: LUCI E OMBRE

Edoardo Carretto, Daniela Barbarini, Debora De Vitis, Letizia Pillitteri, Piero Marone

Laboratorio di Diagnostica Infettivologica ed Epidemiologia Molecolare, Dipartimento di Malattie Infettive, IRCCS Policlinico "San Matteo", Pavia

La ribotipizzazione è una metodica molecolare di digestione enzimatica del DNA genomico di una specie batterica e successiva ibridazione mediante una sonda molecolare dell'operone ribosomale *rrn* di *E. coli* dei soli frammenti di restrizione specifici per la regione policistronica dei geni per l'rRNA. Essa può essere utilizzata in microbiologia clinica sia per l'identificazione di microrganismi (conservazione dei geni per l'rRNA), che per la loro tipizzazione (eterogeneità delle sequenze spaziatrici). Da alcuni anni è stata proposta un'apparecchiatura (Riboprinter, Qualicon) in grado di automatizzare le diverse fasi del processo, fornendo un'immagine digitalizzata dei profili ottenuti che viene comparata, a fini identificativi, con un database interno relativo a oltre 4500 microrganismi. Dal 1999 essa è stata utilizzata presso il nostro laboratorio su oltre 2000 microrganismi, sia per la loro identificazione che per la tipizzazione in studi di sorveglianza delle I.O. I dati della nostra esperienza sottolineano come la ribotipizzazione con sistema automatico sia una metodica rapida, di semplice esecuzione, dotata di buona riproducibilità in esperimenti indipendenti e in centri differenti (indipendente dall'operatore), dotata di un'ottima capacità identificativa. Per quanto riguarda la tipizzazione, essa è intrinsecamente dotata di scarso potere discriminatorio, analizzando una regione genomica estremamente conservata nell'ambito della specie. Ha tuttavia un'elevatissima predittività negativa: ceppi con profili differenti saranno sicuramente non clonali. Su ceppi ad elevata similarità potrà essere utile l'esecuzione di altra metodica più complessa ed elaborata, più discriminante, diretta verso altro target molecolare (RAPD, PFGE, AFLP); in questo senso la ribotipizzazione automatica è indubbiamente utile nel primo screening di ampi numeri di isolati e può essere eseguita contestualmente al verificarsi di un outbreak nosocomiale. Nella nostra esperienza è apparsa molto efficace nella tipizzazione di *Stenotrophomonas maltophilia* ed enterococchi vancomicina-resistenti, meno discriminante per stafilococchi aurei meticillina-resistenti e per *Legionella pneumophila*. Punti critici di tale metodica, dall'elevato costo per campione, sono la scelta preliminare degli enzimi da utilizzare e l'analisi dei risultati, al fine di correggere i limiti intrinseci dell'interpretazione automatica del profilo digitalizzato.

LA DIVERSITÀ BIOLOGICA NELLA DECONTAMINAZIONE DEL SUOLO

Sara Borin

DISTAM, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 2, 20133 Milano. sara.borin@unimi.it

La misura della diversità microbica permette di ottenere informazioni sull'alterazione che un'ecosistema ha subito o sta subendo; i sistemi arricchiti o inquinati mostrano sempre una riduzione della biodiversità o una distribuzione non equilibrata dei ceppi tra le specie, con la conseguente riduzione della capacità di reagire agli stress ambientali [1].

I metodi genotipici, alla base dell'ecologia microbica molecolare, hanno il vantaggio di analizzare tutta la microflora, e non solo la sua frazione coltivabile [2], consentendone inoltre la valutazione della diversità funzionale. Nuovi sistemi di indagine sono infatti in grado di descrivere la composizione della comunità batterica che reagisce a specifici stimoli, ed hanno quindi la potenzialità di studiare le specie metabolicamente attive nelle matrici ambientali [3]. Potrebbe essere quindi possibile individuare gli agenti specifici della degradazione degli inquinanti all'interno della comunità microbica totale che risiede in un suolo contaminato.

Tecniche di DNA-fingerprinting sono state impiegate per lo studio di fattibilità di un intervento di biorisanamento di un suolo contaminato da idrocarburi. Sono stati allestiti microcosmi, ed è stata monitorata la diversità batterica durante il trattamento di bioremediation del suolo e dei suoi effluenti gassosi flussati in biofiltri riempiti con torba o bagassa inoculate con un ceppo di *Pseudomonas* sp. avente capacità degradative. Parallelamente alla conta dei batteri coltivabili, sono stati applicati al DNA totale estratto dalle matrici ambientali 2 diversi metodi di DNA-fingerprinting basati sull'amplificazione degli spaziatori tra 16S e 23S rDNA: ITS-HHP (Intergenic Transcribed Spacer - Homoduplex Heteroduplex Polymorphisms) nel suolo ed ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) nei biofiltri. I risultati hanno dimostrato un aumento della carica microbica e della sua diversità, proporzionalmente all'abbattimento della concentrazione degli inquinanti. Durante il trattamento si è osservata la comparsa di popolazioni microbiche diverse rispetto al tempo iniziale, che in particolare nel biofiltro hanno soppiantato il ceppo inoculante e risultano formate prevalentemente da specie incoltivabili, dato che la maggior parte dei profili ARISA ottenuti dai ceppi isolati da tali campioni non coincidono con il profilo ottenuto dall'analisi del DNA totale.

[1] Øvreås et al. (1998) Appl. Environm. Microbiol. 64, 2739-2742

[2] Amann et al. (1995) Microbiol. Rev. 59, 143-169

[3] Yin et al. (2000) Appl. Environm. Microbiol. 66, 4361-4365

LA TERAPIA DELLA MALATTIA PARODONTALE OGGI

B. Rossetti
(Catania)

Il termine “malattia parodontale” definisce due gruppi eterogenei di patologie infettive del cavo orale, le gengiviti e le parodontiti, che colpiscono le gengive ed i tessuti di supporto dei denti causate dalla perdita dei complessi equilibri tra batteri patogeni presenti nella placca e l'efficacia della risposta locale e sistemica dell'individuo.

Le gengiviti e le parodontiti riconoscono una eziopatogenesi multifattoriale nella quale gioca un ruolo determinante la massa critica dei germi Gram – parodontopatogeni presenti nella placca batterica a livello del solco gengivale, in grado di scatenare un complesso di risposte immunologiche nell'organismo ospite la cui espressione clinica è data dall'infiammazione a livello del solco gengivale (gengiviti) o dall'infiammazione con distruzione dei tessuti di supporto del dente (parodontiti). Poiché non tutte le gengiviti evolvono in parodontiti, appare evidente che la presenza di batteri patogeni costituisce una condizione necessaria ma non sufficiente a determinare lo stato di malattia.

Lo stato di salute parodontale identificato dall'assenza di flogosi e dall'arresto della progressione del riassorbimento osseo dei tessuti di sostegno è il risultato dinamico di una serie, estremamente complessa, di interrelazioni tra: noxae patogene, risposta immunologia locoregionale e sistemica, fattori predisponenti aggravanti propri dell'individuo. Il numero dei fattori in gioco, peraltro ancora non tutti conosciuti, fa sì che l'evoluzione del decorso delle parodontiti sia caratterizzato da periodi di attività distruttiva alternati a periodi, lunghi anche anni, di quiescenza con un andamento caratteristico a poussè fino all'esito finale costituito dalla mobilitazione ed espulsione degli elementi dentari interessati.

Scopo della presente relazione è quello di individuare, le strategie da attuare nella terapia parodontale, proponendo un progetto di gestione personalizzata del paziente parodontopatico, visto nella sua globalità, nell'ottica di una efficace prevenzione secondaria a medio e a lungo termine.

Tale percorso terapeutico deve comprendere una prima fase di identificazione controllo e arresto della patologia parodontale, seguita da una fase riparativa e da una fase di mantenimento e supporto che deve seguire il paziente per tutta la vita. Nasce, quindi, l'esigenza di una diagnosi parodontale accurata che individui i siti attivi, i fattori di rischio, i fattori indicatori di rischio sistemico e i fattori predittori di rischio, allo scopo di poter sfruttare in maniera ottimale le attuali possibilità terapeutiche disponibili: non chirurgiche, chirurgiche e farmacologiche.

BIOFILM MICROBICI E DISPOSITIVI MEDICI IMPIANTABILI

Gianfranco Donelli

Laboratorio di Ultrastrutture, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il crescente e sempre più diffuso ricorso nella pratica clinica all'impianto temporaneo o permanente di dispositivi medici a scopo diagnostico, terapeutico o riabilitativo ha comportato l'insorgere di nuove problematiche di interesse microbiologico ed infettivologico. L'introduzione nell'organismo di tali

“corpi estranei” ne espone infatti le superfici alla colonizzazione da parte di specie microbiche diverse a seconda del distretto corporeo e delle modalità di impianto. A titolo esemplificativo si può far riferimento alle tre seguenti tipologie: 1) l'impianto chirurgico, in distretti corporei normalmente sterili, di dispositivi permanenti quali stent intravascolari, valvole cardiache, protesi ortopediche ecc. che possono divenire oggetto di colonizzazione microbica a seguito di sepsi transienti; 2) l'inserzione per via endoscopica di stent biliari che sono soggetti ad occlusione entro 3-6 mesi dall'impianto a seguito di colonizzazione intraluminale da parte di batteri intestinali che risalgono dal duodeno attraverso la papilla di Vater; 3) l'impianto temporaneo di cateteri intravascolari che realizzano una via di collegamento tra ambiente esterno e distretti solitamente sterili dell'organismo. In tutti questi casi, esaminando mediante microscopia elettronica a scansione la superficie dei dispositivi a tempi variabili dall'impianto si osserva come questa risulti frequentemente colonizzata da microorganismi che si sviluppano dando luogo a biofilm simili a quelli osservabili in ecosistemi naturali. L'osservazione microscopica evidenzia inoltre che i microorganismi sono immersi in una matrice fibrosa di natura polisaccaridica, da essi stessi sintetizzata, nota come “slime.” Talvolta asintomatiche e clinicamente silenti, le infezioni associate ai dispositivi medici impiantabili riconoscono per lo più come agenti eziologici microorganismi saprofiti che si comportano da patogeni opportunisti quali *Stafilococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, ecc. Il trattamento chemioterapico di queste infezioni è di solito assai problematico tanto da richiedere frequentemente l'espianto del dispositivo. I meccanismi di adesione microbica e colonizzazione nonché le modalità di insorgenza della resistenza agli antibiotici che caratterizzano le infezioni associate ai dispositivi medici non sono stati ancora del tutto chiariti e costituiscono quindi punti focali di ricerca di base e applicata. Un ruolo importante sembra comunque attribuibile alle peculiari caratteristiche biologiche e chimico-fisiche del biofilm batterico nel suo complesso che permetterebbero la sopravvivenza delle specie microbiche in ambienti ostili e la loro resistenza all'azione di anticorpi e antibiotici.

ATTUALE APPROCCIO ALLA DIAGNOSI DELLA MALATTIA PARODONTALE

M. De Luca

Università degli Studi di Roma, "La Sapienza", Cattedra di Parodontologia.

Le malattie parodontali rappresentano un gruppo di malattie a carattere infettivo che interessano le strutture di supporto del dente. Nel primo Workshop della Federazione Europea di Parodontologia (1996) venne proposta una classificazione delle malattie parodontali basata sulla gravità della distruzione dei tessuti in relazione all'età del paziente:

1. Gengiviti; 2. Parodontiti ad insorgenza precoce; 3. Parodontiti dell'adulto;

4. Parodontiti ulcero-necrotizzanti. Possono essere caratterizzate da alcuni parametri quali: a. estensione della malattia nella dentatura; b. velocità di progressione; c. risposta alla terapia; d. presenza di specifici microrganismi patogeni; e. presenza di patologie sistemiche; f. presenza di fattori di rischio locali e/o generali. Le gengiviti sono risposte infiammatorie della gengiva marginale all'accumulo di placca batterica. I segni clinici sono eritema del margine gengivale, facilità al sanguinamento, edema e talvolta ipertrofia e/o iperplasia. Vi è l'assenza di perdita di attacco. Le parodontiti dell'adulto sono forme più diffuse di parodontopatia. Esse sono patologie ad eziologia multifattoriale caratterizzate dalla distruzione di una porzione dell'attacco connettivale con una conseguente migrazione apicale del livello di attacco clinico. Sono caratterizzate dalla presenza di tasche, recessioni e riassorbimento di osso. Frequentemente c'è sanguinamento al sondaggio. Le parodontiti ad insorgenza precoce insorgono durante l'infanzia e l'adolescenza e presentano delle forme gravi di distruzione parodontale, tanto nella dentatura decidua quanto in quella permanente. Le parodontiti ulcero-necrotizzanti si caratterizzano per la presenza di ulcerazioni del margine della gengiva e mostrano una rapida progressione. Questa forma di malattia parodontale è di facile riscontro, attualmente, nei pazienti HIV positivi. Essendo le malattie parodontali associate all'accumulo di microrganismi patogeni, l'infiammazione del margine gengivale è la prima manifestazione della patologia e se tale accumulo di placca persiste nel tempo essa può sconfinare verso una parodontite che si caratterizza per la perdita di attacco di connettivo e di osso alveolare.

Attualmente la diagnosi delle malattie parodontali si basa sui segni clinici, sulle caratteristiche che sistemiche del paziente e, quando possibile, sulla valutazione microbiologica dell'infezione. Anche l'analisi del fluido crevicolare assume oggi un significato diagnostico importante, mentre la validità dei test genetici per la suscettibilità alla malattia è ancora dibattuta.

L'INTERFERON NEL CONTROLLO DELLE INFEZIONI VIRALI: TERAPIA SUPERATA O ATTUALE?

Guido Antonelli

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia – Sezione di Virologia – Università "La Sapienza" Roma.

L'interferon (IFN) descritto alla fine degli anni '50 come proteina secreta da fibroblasti in seguito ad infezione virale, è stato successivamente caratterizzato come un complesso gruppo di proteine che partecipa attivamente alla risposta immune dell'organismo contro le infezioni virali. Tale gruppo di proteine viene oggi denominato sistema interferon perché composto da proteine diverse dal punto di vista strutturale e funzionale. Nell'uomo si conoscono almeno 15 sottotipi di IFN α , distinguibili in qualche caso anche dal punto di vista funzionale, e 1 solo tipo di IFN β , IFN γ e IFN ω .

L'introduzione intorno agli anni '70 della tecnologia del DNA ricombinante ha rappresentato una tappa fondamentale della ricerca sull'IFN. Essa da una parte ha permesso di chiarire i meccanismi molecolari di induzione e azione dell'IFN, e dall'altra ha consentito di produrre quantità di IFN tali da permetterne l'utilizzo nella terapia di alcune infezioni virali, di alcune patologie neoplastiche o patologie neurodegenerative. Il successo dell'IFN come agente terapeutico ha conosciuto alti e bassi nel corso degli ultimi 20 anni. Ci sono infatti patologie (virali e non) in cui l'IFN (α , β , γ) è diventato il farmaco di scelta, mentre per altre patologie, nonostante i risultati promettenti iniziali, esso non è arrivato alla registrazione. Tuttavia la progressiva conoscenza della struttura chimica della molecola dell'IFN e dei mediatori coinvolti nella sua produzione ed azione, e la progressiva comprensione dei meccanismi biologici relativi alla sua produzione endogena in condizioni fisiologiche e patologiche ha permesso di ottimizzare la terapia interferonica nelle patologie in cui era già indicato e di ipotizzare il suo utilizzo, o l'utilizzo dei suoi inibitori, in patologie nuove.

ATTUALI ASPETTI EPIDEMIOLOGICI DELLE INFEZIONI NOSOCOMIALI

Ida Mura, Ivana Maida, Giovanni Sotgiu

Istituto di Igiene e Medicina Preventiva – Università degli Studi di Sassari

Nonostante i notevoli progressi nella conoscenza dei fattori di rischio e l'introduzione di numerosi interventi di prevenzione, il problema delle Infezioni nosocomiali (IO) continua a rappresentare un aspetto rilevante e negativo nella attuale complessa architettura dell'assistenza sanitaria. Pur se la definizione ufficiale delle IO in Italia è ancora quella risalente alla circ. MS n. 52/85, l'attuale evoluzione dell'organizzazione dell'assistenza ne ha determinato tuttavia un ampliamento del concetto. Infatti il passaggio da un SSN prevalentemente centrato sull'ospedale come riferimento per l'erogazione di prestazioni assistenziali ad uno *periferizzato* in cui l'assistenza territoriale, domiciliare e primaria, svolge un ruolo almeno paritetico porta a preferire una nuova definizione delle IO come "infezioni riconducibili ad attività assistenziali anche se non strettamente ospedaliere" e a modificarne l'epidemiologia. Dal punto di vista epidemiologico attualmente il fenomeno delle IO, sulla base dei dati della letteratura e pur nella disomogeneità territoriale, si può stimare nel 7,7% in Europa, con il 5% nelle RSA/lungodegenza e l'1% nell'assistenza domiciliare, e nel 5-8% in Italia. I dati internazionali NNIS riportano un trend in decremento, accanto però ad un rilevante aumento sia del rischio per giorno-paziente sia della frequenza di localizzazioni gravi (batteriemie, polmoniti) sostenute per lo più da microrganismi antibioticoresistenti. Relativamente ai tre elementi che interagiscono nel classico modello epidemiologico delle IO, appare evidente la particolare fragilità di equilibrio conseguente al profondo cambiamento delle loro caratteristiche. Gli **agenti eziologici** sono oggi rappresentati per lo più da *Pseudomonas imipenem R*, *VRE*, *MRSA* e vancomicino *IR*, da *Staphylococcus epidermidis MR*, *Candida* e Micobatteri multiresistenti; l'**ospite** è attualmente, oltre al paziente oncologico, il soggetto anziano (gli over65 rappresentano oltre il 18% della popolazione italiana), immunodepresso e sottoposto a trapianti. Acquista particolare rilevanza l'**ambiente**, inteso non più e non solo come *luogo* di degenza, ma come complessa articolazione che prevede una vasta rete assistenziale (ambulatoriale-domiciliare, residenze socio-assistenziali, case di riposo, hospice, ecc.), come insieme di individui che vi operano e come modalità di organizzazione (aspetti strutturali ed architettonici, tecnologici, articolazioni gestionali e funzionali, modelli organizzativi di assistenza, gestione manageriale, management aziendale, ecc.).

LATTOBACILLI AD USO PROBIOTICO: DALLA RICERCA DI BASE ALLE APPLICAZIONI

L. Morelli

Istituto di Microbiologia- Università Cattolica del Sacro Cuore

Via Emilia Parmense 84-29100 Piacenza

Tel. +390523599248 Fax +390523599246 e-mail morelli@pc.unicatt.it

L'uso di lattobacilli come agenti per il controllo positivo della flora intestinale è una pratica che si appresta a festeggiare i suoi primi 100 anni. Metchnikoff, agli inizi del secolo, postulava come il consumo di uno specifico ceppo di lattobacillo (per la storia un *Lactobacillus helveticus*) fosse benefico per la salute. Da allora molti studi sono stati condotti, con alterne fortune, per dimostrare la reale efficacia di questi batteri e l'uso della biologia molecolare ha rivitalizzato un settore di ricerca che era stato accusato di basarsi su dati episodici e non controllati.

La ricerca.

L'introduzione di tecniche di identificazione mediante analisi di specifiche sequenze del DNA ha consentito l'identificazione delle specie di appartenenza di un gran numero di isolati di lattobacilli intestinali in tempi ragionevoli. Inoltre il profilo dei plasmidi, l'analisi del cromosoma mediante Pulse Field Gel Electrophoresis, le tecniche RAPD ed ERIC come pure l'amplificazione di regioni di DNA ceppo-specifiche hanno consentito di identificare sia in modelli animali che in prove cliniche *in umana*, la presenza di specifici ceppi somministrati *per os* o la permanenza per più giorni di ceppi autoctoni, consentendo di valutare l'azione dei singoli ceppi e di capire come molte delle proprietà positive siano ceppo e non specie-specifiche.

Analisi mediante elettroforesi denaturanti (PCR-DGGE) hanno consentito di identificare le popolazioni batteriche dominanti in diversi individui, senza dover ricorrere a lunghe procedure di caratterizzazione.

Le applicazioni.

I risultati della ricerca si sono tradotti in applicazioni sia cliniche che alimentari, basate sull'uso di ceppi specifici, selezionati (a volte brevettati) per determinate attività probiotiche, dimostrate tramite prove *in vitro* ma anche *in umana*. Generalmente questi ceppi sono depositati presso enti internazionali e quindi a disposizione dei ricercatori per il controllo delle loro proprietà. Può essere interessante ricordare come, a fronte di questi nuovi sviluppi, FAO e WHO abbiano ritenuto opportuno elaborare delle linee guida per la valutazione delle proprietà probiotiche di alimenti e prodotti dietetici. Gli alimenti probiotici recentemente introdotti sul mercato dovrebbero quindi essere caratterizzati e prodotti secondo queste Linee Guida per appartenere alla nuova generazione di probiotici, eredi delle intuizioni di Metchnikoff ma arricchiti da 90 anni di ricerca scientifica.

AGENTI INFETTIVI E FLOGOSI ALLERGICA

G. Rasi, S. Bonini

Istituto di Neurobiologia e Medicina Molecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma

Inquadramento del problema¹

Il concetto di allergia, nell'originaria definizione di Clemens von Pirquet, accomunava sia l'immunità nei confronti di agenti infettivi sia le manifestazioni cliniche da ipersensibilità immunologica. Microbiologia e Infettivologia da un lato e Allergologia e Immunologia Clinica dall'altro si sono successivamente sviluppate secondo percorsi di ricerca e applicativi differenziati. Le migliori conoscenze del complesso network cellulare coinvolto nella risposta immune, inducono oggi a ritenere che agenti microbici e allergenici diano luogo a molteplici interazioni genetico-ambientali in grado di influenzarsi reciprocamente. Il ruolo svolto da CD34, recettori TOLL e ICAM-1 rappresentano alcuni degli esempi al riguardo e giustificano sul piano culturale l'orientamento ampiamente diffuso a creare, con differenti aggregazioni, strutture dipartimentali di Microbiologia, Immunologia, Malattie Infettive, Allergologia e Immunologia Clinica.

Il modello interpretativo principale dei rapporti tra stimoli microbici e flogosi allergica si basa sul meccanismo a bilancia tra profilo citochinico di tipo Th1 nei confronti di stimoli intracellulari batterici e virali e profilo citochinico di tipo Th2 nei confronti di stimoli extracellulari parassitari e allergenici. Tale modello interpretativo, seppur sostenuto da numerosi dati epidemiologici e sperimentali, appare tuttavia semplicistico, in relazione a numerosi dati discordanti quali: la reciproca azione favorente tra infezioni virali e malattie allergiche; i complessi rapporti tra parassitosi e allergia; la co-localizzazione genomica tra recettore dell'epatite A e alcuni geni che controllano iperreattività bronchiale e la produzione di IL-4 e IL-13; il sempre maggiore interesse per sottopopolazione in grado di esercitare un effetto regolatorio sia su cellule Th1 sia su cellule Th2.

L'ipotesi igienica²

Numerosi dati epidemiologici sostengono oggi "l'ipotesi igienica", secondo la quale l'elevata e crescente prevalenza delle malattie allergiche sarebbe da mettere in relazione alla diminuzione degli stimoli microbici nei confronti del sistema immunitario soprattutto nei primi mesi di vita.

In effetti, dati personali su ampie casistiche europee e americane, indicano che alcune infezioni – ed in particolare quelle da virus dell'epatite A – sono associate ad una minore prevalenza di sensibilizzazione e di patologia allergica. Il dato tuttavia non può essere esteso a tutti i tipi di infezione ed in particolare alle infezioni respiratorie (che al contrario si associano ad una più elevata prevalenza di asma), né può mettere in dubbio l'utilità delle vaccinazioni che non hanno alcun effetto – secondo i nostri dati – sulla prevalenza delle malattie allergiche.

L'ipotesi igienica, al di là del suo interesse epidemiologico e interpretativo della patomorfosi verificatasi nell'ultimo secolo, suggerisce alcune strategie operative per una educazione del sistema immune attraverso interventi profilattici o terapeutici quali l'uso di prodotti batterici – *M. vaccae* ad esempio -, oligonucleotidi ricchi di sequenze CpG, probiotici.

I dati al riguardo, seppur preliminari soprattutto per quanto riguarda gli studi clinici nell'uomo, appaiono di notevole rilievo e delineano linee di ricerca e sviluppo applicativo di comune interesse per microbiologi, allergologi e immunologi clinici.

Per le indagini personali citate e per i riferimenti bibliografici cfr:

Matricardi P et al. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *Br Med J* 2000; 320: 412.

Matricardi P, Bonini S. High microbial turnover rate preventing atopy: a solution to inconsistencies impinging on the hygiene hypothesis. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1506.

Matricardi P et al. Hay fever and asthma in relation to markers of infections in United States. *J Allergy Clin Immunol* 2002 (in press).

Rasi G et al. Allergic diseases in relation to vaccinations and infectious diseases: two cross-sectional studies in schoolchildren 4 years apart. (under submission).

Bonini S, Rasi G. Allergy, Parasites and the Hygiene Hypothesis. *Science* 2002 (under review).

¹ *Relatore: G. Rasi*

² *Relatore: S. Bonini*

STUDIO POLICENTRICO SULLE INFEZIONI NOSOCOMIALI IN ITALIA (SPIN): RISULTATI CONSEGUITI NEL 2001

M. Bozzolasco, G. Fadda*, G. Nicoletti**, C. Torrisi**, G.C. Schito

Sezione di Microbiologia C.A. Romanzi, DISCAT; Università degli Studi di Genova; * Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del S.Cuore, Roma; ** Dipartimento di Scienze Microbiologiche, Università degli Studi, Catania

Nel corso di 4 giorni indice (27 Settembre, 25 Ottobre; 22 Novembre e 20 Dicembre 2001) 19 Laboratori di Microbiologia Clinica di altrettanti grandi Ospedali distribuiti strategicamente sul territorio del nostro Paese hanno studiato, con l'egida dell'Associazione Italiana per lo Studio degli Antimicrobici e delle Resistenze (AISAR) e il supporto di AVENTIS, l'incidenza di tutte le infezioni nosocomiali rilevandole attraverso opportune schede elettroniche. In totale sono stati osservati 1138 episodi di cui 40 giudicati in seguito come semplici colonizzazioni. La fascia d'età dei pazienti più colpita è stata quella compresa tra i 16 e 65 anni (48.1%), seguita dai soggetti più anziani (38.1%). Le infezioni maggiormente incidenti dal punto di vista generale sono state quelle genito-urinarie (37.2%), delle basse vie respiratorie (18.6%), sistemiche (10.8%), della cute e tessuti molli (7.0%), gastroenteriche e intra-addominali (5.8%), di orecchio, naso e gola (4.9%) e associate a catetere vascolare (4.1%). I reparti più pesantemente colpiti sono stati quelli di Terapia Intensiva (23.6%), Medicina (18.3%), Chirurgia Generale (7.7%), Neurochirurgia (4.2%), Ortopedia (3.5%) e Cardiochirurgia (3.4%). In Rianimazione le infezioni nosocomiali si sono presentate con maggior frequenza come quadri delle basse vie respiratorie (48.9%), sistemiche o associate a catetere vascolare (21.8%) e urinarie (13.9%). Come atteso, è stata osservata notevole variabilità di questi parametri in funzione dei singoli centri partecipanti e della natura dei reparti considerati. I principali patogeni batterici isolati sono stati rappresentati da *Pseudomonas aeruginosa* (19.4%), *Escherichia coli* (15.1%), *Staphylococcus aureus* (14.7%), *S.epidermidis* (6.7%), *Proteus mirabilis* (5.1%), *Enterococcus faecalis* (5.1%), *Enterobacter cloacae* (3.8%), e *Klebsiella pneumoniae* (3.3%). La ripartizione tra microrganismi Gram-negativi e Gram-positivi è stata del 57.29% e 42.7% rispettivamente. La distribuzione degli stessi germi era alquanto diversa considerando i tre tipi di infezione maggiormente incidenti. Nei quadri genito-urinari la prevalenza spetta a *E.coli* (34.5%), *Enterococcus* (17.0%) e *P.aeruginosa* (13.7%) mentre in quelli del polmone e delle basse vie respiratorie *P.aeruginosa* (39.5%), *S.aureus* (23.8%) e *K.pneumoniae* (5.50%) sono dominanti. Nelle infezioni sistemiche è *S.epidermidis* il patogeno più frequente (16.3%), seguito da *S.aureus* (14.6%), *P.aeruginosa* (10.6%) ed *E.coli* (9.7%). La sensibilità ad una vasta serie di antibiotici è stata accertata tramite l'impiego di numerose tecniche. Tra le più utilizzate si annoverano il metodo manuale di Kirby-Bauer (36.6%), lo Sceptor (26.5%), il Microscan (12.3%), il VITEK (9.2%). Verranno riferite le incidenze di resistenza ai principali farmaci antimicrobici dei patogeni nosocomiali isolati nell'ambito del Progetto SPIN.

LE RAGIONI DI UNO STUDIO.

M. Tari¹, N. Piacentini², V. Arcoraci², V. De Lucia³, G. Letizia³, A. Marino³, S. Moretti³, A. Natale³, V. Perone³, A.P. Caputi²
Controllo di Gestione ASLI Caserta¹, Dip. Clinico Sperimentale di Medicina e Farmacologia Università Messina², SIMG³

Le infezioni delle vie urinarie (IVU) rappresentano un problema clinico e socioeconomico rilevante in Medicina Generale (MG). Negli USA le IVU sono responsabili del 5-15% delle visite ambulatoriali e di circa un milione di ricoveri l'anno.

In Italia, secondo il rapporto ISM 2000, le IVU sottoposte ad antibioticoterapia sarebbero 6-6.5 milioni ogni anno. Una Banca dati di MG che raccoglie i dati di circa 700.000 assistiti (Health Search) evidenzia una prevalenza di IVU pari a 2.457/100.000 assistiti in 1 anno, ponendosi al 3° posto tra le cause di infezione.

Nell'ambito di un progetto (Progetto Caserta) approntato al fine di identificare i fattori che influenzano le strategie terapeutiche in MG, tra ottobre e novembre 2000, è stata effettuata una raccolta dati sul management delle IVU che ha coinvolto 73 MMG e 482 pazienti.

Nell'ambito del progetto, alla I fase di monitoraggio degli eventi che conducono ad un intervento terapeutico, segue un programma educazionale di produzione e implementazione di linee guida ed una II fase di analisi delle modalità prescrittive, per valutare l'impatto del processo educazionale tra i MMG.

I risultati della I fase di monitoraggio evidenziano che la cistite acuta (71.6%) è la IVU maggiormente rappresentata. Nel 77,2% coinvolge il sesso femminile, ad un'età media inferiore rispetto ai maschi (50,9 vs 58,8).

Nel trattamento della cistite acuta vengono utilizzate 7 classi di antibiotici per un totale di 27 diverse molecole e i chinolonici coprono quasi il 50% delle prescrizioni. Questi vengono utilizzati maggiormente in seguito ad urinocultura.

I dosaggi di antibiotici ed il ciclo terapeutico si discostano frequentemente da quanto suggerito dalle principali linee guida internazionali e vengono effettuati troppi antibiogrammi nei nuovi casi di cistite acuta non complicata (25,7%) e pochi nelle recidive (60%). La II fase del progetto è stata realizzata grazie ad un database di MG che contiene dati di prescrizioni farmaceutiche motivate scaricati mensilmente da 163 MMG (progetto Panor@mica).

Dal confronto dei dati di prescrizione e dei costi per cistite tra I trimestre 2001 (prima del processo educazionale) e I trimestre 2002 (dopo implementazione delle linee guida) emerge una riduzione dell'uso di fosfomicina ed un aumento degli antimicrobici; in particolare ciprofloxacina e cotrimoxazolo. A fronte di un aumento di prescrizioni per farmaci più costosi la spesa pro-capite per patologia diminuisce, ed il trattamento si adegua maggiormente ai suggerimenti proposti dalle linee guida. Inoltre, non si registra un aumento significativo delle recidive.

LE INFEZIONI DELLE VIE URINARIE IN PEDIATRIA. ASPETTI CLINICI E DIAGNOSTICI

Antonio Boccazzi, Paola Coi, Elena Calcinai

Clinica Pediatrica

Università degli Studi di Milano

Le infezioni delle vie urinarie rappresentano patologia frequente fin dalle prime età della vita. Il loro riconoscimento costituisce spesso il primo segnale di una malformazione dell'apparato genito-urinario ed il loro attento trattamento una importante garanzia di riduzione delle sequele a carico soprattutto del parenchima renale. La sintomatologia classica (stranguria, pollachiuria e iperpiressia) presente soprattutto nel soggetto più grande può invece mancare o apparire sfumata nel bambino più piccolo. La corretta esecuzione di un esame delle urine e dell'urinocoltura permetterà di giungere alla diagnosi etiologica. Il quadro etiologico vede l'E.coli come specie batterica dominante seguita da *Proteus mirabilis* e *Morganii* e da *Klebsiella pneumoniae*. Solo in casi particolare rappresentati di gravi ostacoli alla dinamica urinaria o da precedenti e ripetute terapie antibiotiche si isolano dal campione urinario Enterococchi o *Ps.aeruginosa*.

La presentazione clinica più grave è rappresentata dalla pielonefrite in cui l'infezione si localizza in prossimità del parenchima renale e al bacinetto renale mentre più lievi sono le infezioni basse a carico del tratto distale degli ureteri e della vescica. Il trattamento dovrà comunque prevedere l'impiego di molecole a completa o prevalente eliminazione attraverso l'emuntorio renale e dotate di attività battericida. La scelta nel caso di pielonefrite prevede l'impiego di penicilline protette (soprattutto amoxicillina-clavulanato o piperacillina-tazobactam) o cefalosporine di 3.a generazione o aminoglicosidi (netilmicina) soprattutto per via parenterale in quanto spesso queste patologie sono caratterizzate da una importante compromissione delle condizioni generali, anche se un trattamento per os è accettabile quando il paziente sia in grado di assumere senza problemi farmaci per questa via. Nelle forme basse il trattamento orale è predominante ed alle classi di farmaci sopra indicate si può aggiungere TMP/SMX. L'inizio della terapia deve essere pronto al momento della diagnosi e venire eventualmente adeguato una volta disponibile il risultato dell'urinocoltura e del relativo antibiogramma. Criterio microbiologico principale di scelta sarà dunque costituito dalla resistenza intrinseca alle beta lattamasi, oramai prodotte, almeno in Italia da > 80% dei ceppi di E.coli e dalla maggioranza dei *Proteus spp* e delle *Klebsielle*. Molecole non completamente resistenti, come ad esempio le cefalosporine orali di seconda generazione sia orali sia parenterali, o l'amoxicillina andranno eventualmente riservate ad una seconda considerazione dopo la dimostrazione della completa sensibilità del germe isolato.

LA PATOLOGIA INFETTIVA RESPIRATORIA PEDIATRICA

Antonio Boccazzi, Elena Calcinai e Paola Coi

Clinica Pediatrica Università degli Studi di Milano

Le infezioni respiratorie rappresentano in età pediatrica la principale causa di morbidità e di mortalità e la principale ragione medica alla base di prescrizioni antibiotiche e di sostanze ad attività mucolitica. Quelle delle vie aeree superiori sono le più frequenti e vengono soprattutto seguite in ambiente ambulatoriale mentre per quelle delle vie aeree profonde e nel bambino più piccolo si approfitta maggiormente di ricovero in ambiente ospedaliero protetto. Tra le infezioni delle vie aeree superiori (URTI), l'etiologia virale domina il quadro delle faringotonsilliti, mentre predominano i casi ad etiologia batterica fra le otiti medie e le sinusiti. La triade *S.pneumoniae*, *H.influenzae* e *M.catarhalis* è responsabile della quasi totalità di queste forme, ad eccezione della faringotonsillite batterica in cui *S.pyogenes* è il principale agente causale batterico. Anche per le forme profonde (LRTI) (polmoniti accompagnate o meno da interessamento pleurico questi rappresentano i principali agenti causali, a cui si aggiungono soprattutto nei soggetti in età scolare i batteri atipici (*M.pneumoniae* e *C.pneumoniae*). La scelta del trattamento (necessariamente empirica data l'impossibilità della definizione etiologica con la esclusione dei batteri atipici per le LRTI e dello *S.pyogenes* per le faringotonsilliti) deve basarsi su una valutazione farmacodinamica dello schema di trattamento il che compendia non solo la scelta di molecole capaci di raggiungere e di mantenere in circolo e nel sito infetto concentrazioni efficaci, ma anche di dimostrarsi resistenti ai principali meccanismi di resistenza espressi dalla popolazione batterica comunitaria. Questi meccanismi di resistenza sono principalmente rappresentati dalla produzione di beta lattamasi da parte di *H.influenzae* e di *M.catarhalis* e dalla resistenza alla penicillina espressa da *S.pneumoniae*. L'unico problema di resistenza evidenziato invece da *S.pyogenes* è rappresentato dai profili di resistenza a macrolidi e lincosamidi, mentre nessuna indicazione di una diminuita sensibilità ai beta lattamici viene segnalata in Italia così come nel resto della realtà internazionale. A fronte di questo quadro di possibili resistenze, l'impiego di beta lattamici non protetti contro le beta-lattamasi non può venire considerato come di scelta, così come l'utilizzo di cefalosporine orali per il rischio di una ridotta efficacia nei confronti di ceppi di *S.pneumoniae* ad elevata resistenza alla penicillina. L'indicazione quindi al trattamento dovrà prevedere l'utilizzo di molecole o di associazioni resistenti alle beta lattamasi e con marcata attività nei confronti di *S.pneumoniae* Pen-R ed in cui sia eventualmente possibile un incremento della posologia in caso fosse indicato raggiungere più elevate concentrazioni al sito infetto. Fra queste l'associazione amoxicillina/clavulanato soddisfa tutti i requisiti essendo in grado di raggiungere nel parenchima polmonare così come nel fluido dell'orecchio medio efficaci concentrazioni battericide e di mantenerle nel tempo. L'eventuale incremento della posologia fino alla somministrazione di amoxicillina alla dose di 80 mg/kg/die t.i.d. si è inoltre dimostrata in grado di assicurare l'eradicazione di ceppi di *S.pneumoniae* Pen-HR con MIC di 4 mg/L per la penicillina, costituendo così un sicuro ed efficace presidio terapeutico. Nelle forme da atipici, invece, la scelta andrà guidata, nei casi dimostrati positivi, sulla base delle indicazioni sierologici e con l'impiego di un macrolide. Una corretta pronta e razionale scelta terapeutica è importante per assicurare il pronto controllo dell'episodio infettivo, ma anche per limitare improprie pressioni selettive sull'ecologia batterica comunitaria, principale causa dell'insorgenza e della diffusione di resistenze antibiotiche.

MARCATORI BIOLOGICI ED IMMUNOLOGICI DELL'INTERFERON DI TIPO I IN PAZIENTI AFFETTI DA DIVERSE PATOLOGIE A DECORSO CRONICO.

Carolina Scagnolari¹, Francesca Bellomi¹, Vito Lavolpe², Gabriella De Vito¹, Francesca De Pisa¹, Maria Giuseppina Stillitano¹, Rossella Coviello³, Milvia Casato³, Guido Antonelli¹.

1-Dip Med Sper e Patol, Univ "La Sapienza", RM; 2- Dip Neur e Sc Psic, Univ di Bari, Bari; 3- Dip Med Clin – Policlinico Umberto I, Univ "La Sapienza", RM.

E' noto che il siero di pazienti affetti da diverse malattie croniche e/o autoimmunitarie può contenere quantità variabili di interferon (IFN) ed in qualche caso ad esso e' stato attribuito un ruolo patogenetico. Gli IFN esercitano la loro attività antivirale, immunomodulatoria e di regolazione della crescita cellulare interagendo con specifici recettori cellulari ed inducendo la sintesi di proteine effettrici. L'espressione di tali proteine può rappresentare un utile indice di attivazione dell' IFN endogeno e di quello somministrato a scopo terapeutico.

L'obiettivo che ci siamo proposti in questo studio è stato quello di esaminare e confrontare l'attivazione del "sistema IFN" endogeno o dopo induzione da una singola somministrazione di IFN alfa o beta in pazienti con patologie croniche differenti: sclerosi multipla remittente recidivante (SMRR)-IFN beta, epatite cronica da virus C (HCV) e crioglobulinemia (EMC)-IFN alfa. In particolare sono stati considerati i seguenti marcatori immunologici e biologici dell'IFN: la β_2 microglobulina (β_2m), la neopterina (NPT), la 2-5-oligoadenilato sintetasi (2-5OAS) e l'MxA. I principali risultati ottenuti indicano che livelli endogeni maggiori di β_2m (5.93 ± 3.25 $\mu\text{g/ml}$; range 2.5-13.6 $\mu\text{g/ml}$), NPT (19.20 ± 9.00 nmol/l ; range 7.11-40 nmol/l) ed mRNA-MxA (\log_{10} 6.89 ± 0.51 ; range \log_{10} 6-7) sono presenti in pazienti affetti da EMC mentre livelli endogeni minori di 2-5OAS (20.51 ± 14.04 pmol/dl ; range 2-57 pmol/dl) e di NPT (7.32 ± 2.87 nmol/l ; range 2.7-15 nmol/l) sono presenti rispettivamente in pazienti affetti da SMRR e HCV. Nei pazienti esaminati dopo la somministrazione di IFN si assiste quasi invariabilmente ad un incremento dell'espressione dei sopracitati marcatori dell'IFN. Tale incremento è differente tra i vari marcatori biologici ed immunologici dell'IFN, ed è più elevato per l'MxA. In conclusione i risultati nel loro insieme mostrano che uno stato diverso di attivazione endogena del "sistema IFN" è presente tra pazienti affetti da SMRR, HCV e EMC e suggeriscono che l'IFN, una volta somministrato, agisce in modo differenziato sull'espressione delle sue proteine effettrici a seconda del tipo di malattia. Il significato patogenetico e clinico di tali osservazioni e' ancora oggetto di studio.

FATTORI VIRALI E DELL'OSPITE NELLA PREDITTIVITA' DI RISPOSTA AL TRATTAMENTO INTERFERONICO IN PAZIENTI AFFETTI DA EPATITE CRONICA DA HCV.

Bellomi F (1), Riva E (4), Scagnolari C (1), Antonelli L (2), Brogi A (2), Turriziani O (1), De Vito G (1), Roffi L (3), Maggi F (5), Dianzani F (4), Antonelli G (1).

1) DIP MED SPER E PATOL, UNIV "LA SAPIENZA", RM 2) DIP MAL INF "POLICLINICO UMBERTO I", RM 3) DIP MED, OSP CIVILE, SONDRIO 4) LIBERO IST UNIV "CAMPUS BIOMEDICO", RM. 5) DIP PATOL SPER, UNIV PISA.

Gli studi sull'efficacia terapeutica degli interferon (IFN), ed in particolare dell'IFNa, nella epatite cronica da virus C hanno dimostrato che dopo trattamento prolungato con IFNa (da solo o in combinazione) si può osservare una normalizzazione delle transaminasi, un abbattimento o scomparsa della carica virale plasmatica ed un miglioramento del quadro istologico a livello epatico. Tuttavia una significativa percentuale di soggetti non risponde alla terapia o presenta una ripresa della malattia quando la terapia viene sospesa. Abbiamo quindi deciso di dedicarci alla identificazione dei fattori predittivi di risposta al trattamento con IFN nell'epatite cronica C. In particolare, ci siamo dedicati alla identificazione dei marcatori precoci in grado di predire se un paziente risponderà o no alla terapia. A tale scopo stiamo monitorando lungo la terapia, ma anche subito dopo l'inizio della stessa (a 0, 24, 48 ore dalla prima somministrazione di IFNa), alcuni marcatori virologici, biochimici, biologici o immunologici in circa 60 pazienti affetti da epatite cronica da virus C. I principali risultati ottenuti dimostrano che nel 75% dei pazienti esaminati si verifica una riduzione della carica virale di almeno 0,3 Log dopo 24 e/o 48 ore dalla prima somministrazione di IFNa; tale riduzione misurata a 48 ore sembra correlare con il genotipo e con la risposta clinica. Per quanto riguarda i fattori dell'ospite abbiamo misurato i livelli di espressione di proteine indotte dall'IFN quali la proteina MxA, la neopterina e la b2-microglobulina (b2-m). Dall'analisi dell'espressione, nei PBL dei pazienti, dell'mRNA per l'MxA è emersa un'elevata variabilità sebbene la farmacocinetica dell'IFNa mostri che l'andamento della concentrazione sierica di IFN, nella maggior parte dei pazienti (80%) presenta un picco a 6 ore dalla somministrazione del farmaco. Sulla base dei dati ottenuti si è visto inoltre che l'IFN induce un aumento significativo dell'espressione di mRNA-MxA solo nei gruppi dei soggetti classificabili come "rispondenti alla terapia" una volta concluso il trattamento. Anche se preliminari invece, i risultati relativi a neopterina e b2-m suggeriscono che tali mediatori non rappresentano utili marcatori di risposta.

IMPROVED OUTCOME OF HDV INFECTION AFTER CHALLENGE IN WOODCHUCKS VACCINATED WITH MF59-ADJUVANTED HEPATITIS DELTA ANTIGEN

Emilio D'Ugo,¹ Marino Paroli,² Giampiero Palmieri,³ Roberto Giuseppetti,¹ Claudio Argentini,¹ Elena Tritarelli,¹ Roberto Bruni,¹ Vincenzo Barnaba,² Michael Houghton,⁴ and Maria Rapicetta^{1*}

¹Laboratory of Virology; Istituto Superiore di Sanità; Viale Regina Elena, 299; 00161 Rome, Italy

²Laboratory of Molecular and Cellular Immunology; Istituto I Clinica Medica

³Pathological Anatomy Chair, Tor Vergata University, Rome, Italy - ⁴Chiron Corp.; Emeryville, CA, USA

BACKGROUND. The hepatitis delta virus (HDV) is a defective RNA virus which requires the presence of hepatitis B surface antigen (HbsAg or WHVAg) to support its life cycle. A worse prognosis has been reported in HDV superinfected individuals. Although the most effective means of preventing HDV infection is by preventing HBV infection, there are an estimated 350 million HBV chronic carriers worldwide, at risk of becoming superinfected with HDV.

AIMS AND METHODS. We evaluated an HDV vaccine consisting of the small nucleoprotein (HDAg) (p24) and adjuvanted with MF59 or Freund's adjuvant (FA). Five woodchucks received the MF59/p24 vaccine; five received FA/p24 (n=5), and three were not vaccinated (controls). Animals were challenged 8 weeks post-vaccination with a subpassage of HDV P15 (10⁶ geq/ml). Humoral and T-cell-mediated responses to WHV and HDAg were measured (anti HDV; Abbott, USA; WHVcAb, WHVeAb; Elecsys, Roche; proliferation assay).

RESULTS. The MF59/p24 animals lived longer than the FA/p24 animals: 25 weeks post-challenge, all 4 WHV-DNA positive MF59/p24 animals were still alive, compared to 2 of the 4 FA/p24 animals and 1 control. Dot-blot analysis (spot hybridization assay) revealed differences in the time of appearance of serum HDV-RNA and in the persistence of high HDV-RNA levels. HDV-RNA (spot hybridization and RT-PCR) was virtually absent in the autopsied livers of 2 MF59/p24 animals; levels were high in all FA/p24 animals and controls. Anti-HD antibodies appeared earlier in the FA/p24 animals. Just before challenge, an HDAg-specific T-cell response was detected in 2 of the 5 MF59/p24 animals and in 3 of the 5 FA/p24 animals. All MF59/p24 animals showed a response to HDAg-derived peptides, compared to 2 FA/p24 animals and 1 control. Histological liver analysis (hematoxylin-eosin; Ishak grading) before and after challenge revealed acute hepatitis-like lesions only in the controls.

CONCLUSIONS. The MF59/p24 vaccine, compared to FA/p24, seems to better control infection in terms of viral replication and survival, and this may be related to the T-cell response.

STUDIO DELLA CAPACITÀ NEUTRALIZZANTE DI ANTICORPI MONOCLONALI UMANI DIRETTI CONTRO HCV MEDIANTE PSEUDOTIPI VIRALI

Roberto Burioni¹, Nicasio Mancini¹, Filippo Canducci², Mario Perotti¹, Pietro E Varaldo¹ e Massimo Clementi²

¹Istituto di Microbiologia, Università di Ancona

²Università Vita-Salute San Raffaele, IRCCS Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

Uno degli aspetti più interessanti e meno spiegati di alcune infezioni virali è rappresentato dalla mancanza di protezione nei confronti della reinfezione nonostante la presenza di una intensa risposta immune, che spesso rappresenta addirittura lo strumento principale per la diagnosi. In questi casi la comprensione del rapporto ospite-parassita è cruciale sia per comprendere la storia naturale dell'infezione, sia per progettare vaccini efficaci. L'infezione da HCV è paradigmatica in questo senso. La glicoproteina E2 di HCV (HCV/E2) rappresenta uno dei bersagli principali della risposta immune e senz'altro potrebbe essere una candidata per lo sviluppo di un vaccino antivirale. Il ruolo degli anticorpi diretti contro questa struttura virale, tuttavia, non è ancora chiarito, in quanto una reinfezione può avvenire anche in presenza di un alto titolo anticorpale contro HCV/E2. La dissezione della risposta immune effettuata mediante clonaggio del repertorio anticorpale umano in vettori combinatoriali di esposizione fagica ha mostrato come alcune funzioni biologiche degli anticorpi anti-HCV/E2 suscitati dall'infezione naturale, quali la capacità di bloccare il legame di HCV/E2 al bersaglio cellulare, siano profondamente variabili da clone a clone pur in presenza di identiche affinità di legame antigene-anticorpo.

Purtroppo lo studio delle funzioni degli anticorpi antivirali, potenzialmente utilissimo per comprendere meglio il rapporto virus-ospite, è fortemente limitato dalla impossibilità di coltivare *in vitro* HCV.

In questa presentazione si descrive l'effetto di anticorpi monoclonali umani diretti contro HCV/E2, derivati da un paziente cronicamente infetto, nei confronti dell'infezione di cellule HepG2 da parte di uno pseudotipo virale derivato dal virus della stomatite vescicolare nel quale le proteine dell'*envelope* sono state sostituite dalle glicoproteine E1 ed E2 di HCV. Due cloni anticorpali sono stati in grado di neutralizzare gli pseudotipi virali ad una concentrazione di 10⁶ug/ml, mentre altri due sono risultati completamente inattivi. Un quinto clone sembra in grado di facilitare l'entrata degli pseudovirus nelle cellule a basse concentrazioni.

Questi dati possono fornire una base molecolare per la comprensione della mancanza di protezione e della possibilità di una reinfezione anche in presenza di una intensa risposta anticorpale specifica.

M40401, UN COMPOSTO SOD-MIMETICO CON POTENTE ATTIVITÀ ANTI-HIV NEI MACROFAGI, PREVIENE L'APOPTOSI NEGLI ASTROCITI.

S. Aquaro¹, D. Salvemini², C. Muscoli³, T. Granato⁴, A. Modesti¹, D. Rotiroti³, V. Mollace³, R. Calì¹, C.F. Perno¹.

¹Università di Roma Tor Vergata; ²MetaPhore Pharmaceuticals Inc, St Louis, USA; ³Università della Magna Graecia; ⁴IBAF CNR, Catanzaro.

I macrofagi (M/M) infettati da HIV producono e rilasciano superossido ed altri fattori neurotossici che inducono apoptosi. Lo scopo della nostra ricerca è stato verificare l'attività anti-HIV ed anti-apoptotica di un composto non-peptidico M40401 SOD-mimetic (superoxide dismutase mimetic). Una linea di astrociti umani è stata incubata con sovrantanti di M/M infettati con HIV e trattata, ove richiesto, con M40401 o L-NAME (un inibitore della sintesi di ossido nitrico). La vitalità cellulare degli astrociti esposti ai sovrantanti dei M/M infettati da HIV ha subito una notevole riduzione riscontrabile già al giorno 5 e massima al giorno 10 (90% delle cellule morte, rispetto al controllo). L'analisi al FACS ha evidenziato la presenza di apoptosi nel 49% (p: 0.001) e nel 7% di astrociti rispettivamente esposti o non esposti ai sovrantanti di M/M HIV infetti. Inoltre, la microscopia elettronica ha permesso di osservare la perdita di materiale citoplasmatico, la presenza grandi vacuoli, nonché fenomeni di condensazione e marginalizzazione della cromatina negli astrociti esposti ai sovrantanti di M/M infettati da HIV. La presenza di apoptosi, in queste cellule, è risultata correlare con la produzione di superossido (121 nmol di MDA/mg proteine, con un incremento di produzione di MDA di circa 9 volte superiore rispetto ai controlli). Il 53% (p: 0.001) di astrociti esposti ai sovrantanti dei M/M HIV infetti è risultato positivo all'analisi tramite TUNEL, di contro le cellule trattate con M40401 (30 µM) non mostravano segni di frammentazione del DNA. Anche la produzione di MDA nelle colture astrocitarie esposte ai sovrantanti di M/M infettati con HIV è stata fortemente inibita dal trattamento con M40401. Al contrario, il trattamento con L-NAME (100 µM) non ha impedito sia l'apoptosi sia la produzione MDA. Inoltre, M40401 (30 µM) ha mostrato una potente efficacia antivirale nei M/M infettati con HIV (99% di inibizione della replicazione virale rispetto ai controlli, p: 0.001). L'inibizione dell'apoptosi negli astrociti non è, comunque, da porsi in relazione all'attività anti-HIV del composto, in quanto queste cellule non sono suscettibili all'infezione da HIV. I risultati descritti evidenziano il ruolo dello stress ossidativo mediato dai M/M infettati da HIV come un meccanismo importante della neurodegenerazione in corso di infezione, e suggeriscono l'utilità di composti come M40401, non solo dotati di attività antivirale, ma in particolare capaci di prevenire il danno in cellule neurali.

RUOLO DEL GSH E DI BCL-2 NELL'INFEZIONE DA VIRUS INFLUENZALE

¹L. Nencioni, ¹A. Iuvara, ¹L. Hernandez, ²A.T. Palamara, ¹E. Garaci.

¹Dip. Med. Sper. Univ. Roma "Tor Vergata"; ²Fac. Farmacia Univ. Roma "La Sapienza".

Lo stato ossido-riduttivo (redox) svolge un ruolo chiave nel controllo della replicazione di molti virus, così come nella definizione della risposta cellulare all'infezione. È noto che sia la replicazione virale, sia l'apoptosi indotta da virus si associano spesso ad uno stato intracellulare pro-ossidante, mentre diverse sostanze antiossidanti svolgono un ruolo antivirale ed anti-apoptotico. Nostri precedenti studi hanno dimostrato che, in diversi sistemi cellulari, l'espressione della proteina anti-apoptotica Bcl-2 è strettamente correlata ad alti livelli di glutatione (GSH), noto antiossidante intracellulare. Inoltre, le cellule Bcl-2+ risultano meno permissive di quelle Bcl-2- per la replicazione del virus influenzale. Il nostro studio è stato quindi teso a delineare i meccanismi con cui i due fattori intervengono nel controllo della replicazione del virus influenzale e dell'apoptosi indotta dal virus stesso. A questo scopo, sono state utilizzate due linee cellulari: MDCK (basso contenuto di GSH, Bcl-2-); SH-SY5Y (alto contenuto di GSH, Bcl-2+).

Dopo 24 ore di infezione con il virus dell'influenza A (PR8 H1N1), le cellule MDCK, pienamente permissive al virus, morivano per apoptosi in una percentuale variabile tra il 38 ed il 45%, contro il 20-30% delle cellule SH-SY5Y. La quota delle cellule apoptotiche sembrava non correlare con la quantità di virus rilasciato. Infatti, in diversi esperimenti, il titolo virale riscontrato nel sovrantante delle SH-SY5Y era inferiore del 98% a quello delle MDCK. L'analisi delle proteine virali, effettuata mediante western blot, dimostrava che le proteine precoci nucleocapsidiche venivano espresse in quantità paragonabile sia nelle cellule SH-SY5Y che nelle MDCK, nonostante le differenze nella produzione virale. Al contrario, l'espressione delle proteine tardive HA ed M era significativamente inferiore nelle SH-SY5Y. Il trattamento con un inibitore della neo-sintesi di GSH (butionina-sulfoximina, BSO), induceva un aumento nell'espressione delle stesse proteine, senza provocare modificazioni nella produzione virale così come nella quota di cellule apoptotiche. Tali risultati indicano che Bcl-2 possa interferire con il rilascio di virus con un meccanismo indipendente dal GSH. Essi inoltre suggeriscono che l'apoptosi possa costituire un importante fattore patogenetico anche in condizioni di limitata permissività per il virus, quali quelle che si realizzano in cellule che esprimono Bcl-2 e contengono alti livelli di GSH.

GLI EFFETTI DI TAT SUI PODOCITI (IPERPLASIA, ATTIVAZIONE DEL CITOSCHELETRO, REDISTRIBUZIONE DELLA NEFRINA) COSTITUISCONO MECCANISMI POTENZIALI DEL DANNO RENALE NEI PAZIENTI HIV-POSITIVI

Bottelli A. 1, Doublier S. 2, Camussi G.2, Conaldi P.G.1

1Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica, Università dell'Insubria; 2Centro Ricerche di Medicina Sperimentale, Università di Torino

La nefropatia HIV-associata è caratterizzata da grave proteinuria, spesso con insufficienza renale progressiva, danno tubulo-interstiziale e glomerulopatia collassante con iperplasia e disregolazione dei podociti. Nei nostri esperimenti le cellule glomerulari epiteliali (podociti), a differenza delle cellule tubulari e mesangiali, non sono risultate permissive alla replicazione di HIV. Abbiamo però rilevato che la proteina virale Tat stimola in modo rilevante la proliferazione dei podociti. Test con peptidi corrispondenti ai differenti domains proteici hanno dimostrato che la regione basica di Tat gioca un ruolo prevalente in questo fenomeno. La stimolazione iperplastica viene esercitata anche da Tat immobilizzata: l'effetto sembra pertanto dovuto all'interazione della proteina con molecole di membrana. Esperimenti con anticorpi specifici hanno escluso il coinvolgimento di potenziali recettori di Tat quali integrine e VEGF-R. Dato che β -d-xyloside, un inibitore della sintesi dei proteoglicani, causa una riduzione significativa dell'effetto proliferativo, l'attività biologica di Tat sui podociti sembra dipendere dalla sua interazione coi proteoglicani di superficie. I nostri risultati dimostrano che Tat promuove la produzione di bFGF da parte dei podociti e suggeriscono il coinvolgimento di questo fattore nell'effetto iperplastico. Tat determina inoltre una riduzione dell'espressione di WT-1 Ag e sinaptopodina, marcatori di differenziazione dei podociti, e alterazioni del citoscheletro (modificazioni della forma cellulare e depolimerizzazione delle fibre di actina). E' stato dimostrato che i podociti svolgono una funzione centrale nella permeabilità glomerulare attraverso l'espressione della proteina transmembrana nefrina. Stimoli che alterano il citoscheletro possono modulare la distribuzione della nefrina sulla superficie podocitaria. Abbiamo pertanto indagato il possibile rapporto tra esposizione dei podociti a Tat e proteinuria. I risultati ottenuti dimostrano che la proteina virale causa in modo dose-dipendente una rapida redistribuzione ed una scomparsa transiente della nefrina dalla superficie cellulare, presumibilmente per attivazione di meccanismi di shedding poiché prove di RT-PCR hanno dimostrato l'assenza di inibizione trascrizionale. In test effettuati su monostrati di cellule coltivate su membrane transwell Tat è risultata aumentare in modo rilevante la permeabilità dei podociti all'albumina. In conclusione, i nostri dati sperimentali dimostrano che l'interazione di Tat coi podociti può concorrere in modo determinante alla patogenesi della proteinuria e alle manifestazioni istopatologiche di danno glomerulare che interessano un numero rilevante dei pazienti HIV-positivi.

INFLUENZA DELLE MODALITA' DEL CHALLENGE SULLA EFFICACIA PROTETTIVA DI UN VACCINO ATTENUATO CONTRO L'AIDS FELINO

Mauro Pistello, Francesca Bonci, Patrizia Isola, Paola Mazzetti, Lucia Zaccaro, Donatella Matteucci, Norman Flynn* e Mauro Bendinelli
Centro Retrovirus e Sezione Virologia, Dipartimento di Patologia Sperimentale B.M.I.E., Università di Pisa; *Dipartimento di Patologia Veterinaria, Università di Glasgow, Regno Unito

Al fine di valutare efficacia ed ampiezza protettiva di potenziali vaccini antilentivirali attenuati, gatti *specific pathogen-free* sono stati vaccinati con virus attenuato della immunodeficienza felina di sottotipo A, ceppo Petaluma (FIV-Pet), e sfidati con il ceppo virulento FIV-UK8, dello stesso sottotipo ma 9,9% divergente in Env. Il challenge è stato condotto con due modalità diverse, e precisamente *cell-free* per via sistemica o *cell-associated* per via mucosa. Questa seconda metodica riproduce una delle modalità principali di trasmissione di HIV.

Come atteso, successivamente alla somministrazione endovenosa di FIV-Pet fortemente attenuato a seguito di prolungata propagazione *in vitro*, gli animali hanno sviluppato infezioni di basso grado, caratterizzate da ridotti livelli di viremia plasmatica e provirale, elevati titoli anticorpali e numeri di linfociti T CD4⁺ circolanti stabili. Dopo 18 mesi dalla vaccinazione, quattro vaccinati e sei controlli sono stati sfidati via peritoneo con uno stock *cell-free* di FIV-UK8. Nel successivo monitoraggio, durato 15 mesi, gli animali vaccinati hanno dimostrato totale assenza di sequenze virali di tipo FIV-UK8 e di altri elementi indicativi dell'attecchimento del virus sfidante, evidenziando così una robusta protezione contro challenge sistemico con virus eterologo. In contrasto, tutti i controlli non vaccinati hanno sviluppato infezione attiva.

Al termine di tale esperimento, gli animali vaccinati sono stati nuovamente sfidati con FIV-UK8, utilizzando però leucociti periferici infettati e somministrati per via vaginale. Tutti i vaccinati sono risultati sensibile a FIV-UK8, senza differenze significative rispetto a sei animali *naive* di controllo. Per valutare se la mancanza di protezione osservata dopo questo secondo challenge era dipeso da un affievolirsi nel tempo della immunità vaccinale piuttosto che dalla diverse modalità del challenge, gruppi di animali vaccinati 48 mesi prima ma mai sfidati e di animali *naive* di controllo sono stati sfidati con FIV-UK8 *cell-free* per via intraperitoneale. Mentre i controlli si sono infettati, gli animali vaccinati sono risultati ancora del tutto protetti, escludendo così un ruolo importante del fattore tempo. Questi risultati dimostrano che la vaccinazione con un lentivirus attenuato può conferire protezione di lunga durata contro un ceppo virulento dello stesso sottotipo anche se sostanzialmente divergente in Env. Tale protezione è tuttavia risultata dipendente dalle modalità di somministrazione del virus challenge, evidenziando così un'ulteriore difficoltà da superare nello sviluppo di efficaci vaccini antilentivirali.

USO DELLA TECNOLOGIA “DNA MICROELECTRONIC CHIP ARRAY” PER L’IDENTIFICAZIONE DELLE SPECIE DI MICOBATTERI PIÙ RILEVANTI PER LA PATOLOGIA UMANA

M. Sanguinetti, L. Novarese, B. Fiori, F. Ardito, B. Posteraro, L. Romano e G. Fadda
Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del S. Cuore, Roma

Per semplificare l’identificazione batterica, recentemente è stata sviluppata la tecnologia dei “microarray” che consente di analizzare migliaia di differenti loci genetici in un breve periodo di tempo. La maggior parte di questi sistemi richiede grandi quantità di DNA “template” per poter correttamente evidenziare DNA o RNA di interesse. Questa problematica è stata superata dall’utilizzo dei “chip” microelettronici che permettono di analizzare quantità molto piccole di DNA. In tale tecnologia, il DNA amplificato, opportunamente biotinilato, viene fatto aderire elettricamente alla superficie del “microchip”, coperta da una matrice di agaroso cui è legata covalentemente streptavidina; quindi denaturato *in situ* e ibridato con coppie di sonde oligonucleotidiche marcate con i fluorofori Cy3 e Cy5. La specificità di legame di ogni sonda è ottenuta mediante successivi incrementi della temperatura di ibridazione (stringenza termica).

In questo studio, tale tecnologia è stata valutata per l’identificazione di 14 specie di micobatteri. I prodotti di PCR erano ottenuti mediante primer che amplificano sequenze del DNA ribosomale 16S conservate e specifiche del genere *Mycobacterium*. Le sonde erano disegnate in modo da riconoscere, invece, le sequenze variabili e specifiche delle seguenti specie di micobatteri: *M. tuberculosis*, *M. terrae*, *M. xenopi*, *M. triplex*, *M. smegmatis*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. intracellulare*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. avium*. Inoltre è stata inclusa una sonda che riconosce il genere *Mycobacterium*, per confermare la specificità dell’amplificato. Le sonde, una marcata con Cy3 e l’altra con Cy5, sono state quindi abbinata sulla base del Tm a formare sette coppie. Gli amplificati ottenuti da 90 ceppi di micobatteri (25 *M. tuberculosis*, 20 *M. xenopi*, 5 *M. smegmatis*, 6 *M. intracellulare*, 5 *M. chelonae*, 10 *M. avium*, 5 *M. terrae*, 5 *M. gordonae*, 3 *M. fortuitum*, 3 *M. kansasii*, 1 *M. triplex*, 1 *M. malmoense* e 1 *M. marinum*) sono stati quindi ibridati con tali coppie di sonde. Ogni sonda era in grado di riconoscere in maniera specifica l’amplificato della specie corrispondente. I risultati concordavano perfettamente con quelli ottenuti mediante altri metodi molecolari (*hsp 65* PCR-REA, PCR reverse hybridization) e test biochimici. I dati suggeriscono che la tecnologia “DNA microelectronic chip array” può essere utilizzata per l’identificazione rapida di micobatteri di interesse clinico.

LA LIGASE CHAIN REACTION NELLA DIAGNOSI DI INFEZIONE TUBERCOLARE E NELLA VALUTAZIONE DELLA TERAPIA.

Agostino ¹ROSSI, Antonio ¹TAMBORINI, Alessandro ¹BASSANI, Paolo ²GROSSI, Antonio ¹TONIOLO.
*1*Laboratorio di Microbiologia e *2*Clinica delle Malattie Infettive, Università dell’Insubria e Ospedale di Circolo, Varese

La tecniche di amplificazione genica hanno significativamente migliorato la diagnostica dell’infezione da *Mycobacterium tuberculosis*. Il metodo LCR [ligase chain reaction; Abbott SpA, Roma] utilizza come bersaglio il gene *Pab*, che codifica per una proteina di 38kDa prodotta in vivo da *M. tuberculosis*. I campioni per ricerca di micobatteri pervenuti negli anni 1998-2001 sono stati processati con NALC-NaOH 2% ed i pellet ottenuti sono stati utilizzati per l’indagine microscopica, la coltura e l’indagine molecolare. Su tutti i campioni positivi è stata valutata la sensibilità ai farmaci antitubercolari. Sono stati analizzati 3.419 campioni mediante LCR (espettorato, faringoaspirato, broncoaspirato, broncolavaggio, gastroaspirato tamponato, liquido pleurico e peritoneale, aspirati o biopsie linfonodali). In parallelo sono stati eseguiti 804 controlli sia negativi che positivi. Uno studio preliminare in vitro ha rilevato una correlazione diretta tra numero di CFU nel campione e segnale LCR. Questo risultato è stato confermato dall’analisi dei campioni patologici nei quali si è dimostrata una correlazione diretta tra CFU valutate con il metodo colturale e segnale LCR.

Su 54 pazienti sono state eseguite indagini molecolari e colturali anche nel corso del trattamento antitubercolare. Nei pazienti con tubercolosi polmonare con buona evoluzione clinica si è ottenuta una progressiva riduzione sia delle CFU che del segnale LCR, con negativizzazione in 2-6 mesi. Nei pazienti HIV-positivi si è ottenuta la negativizzazione solo dopo 9-12 mesi. Nei pazienti con tubercolosi polmonare complicata (fibrotorace, pleuropolmonite, empiema pleurico) si è raggiunta la negativizzazione solo in tempi superiori ai 18 mesi. Nei pazienti infettati da ceppi MDR il segnale LCR non si è ridotto per oltre 12 mesi, così come gli esami colturali. Sulla base di questi risultati, nei pazienti in terapia antitubercolare sembra indicato – oltre ai normali controlli clinico-radiologici - anche un controllo molecolare a intervalli di circa 2 mesi.

NUOVO METODO PER LA RILEVAZIONE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* NEGLI ALIMENTI

Ingianni A.*, Quartuccio M.***, Madeddu M.A.*, Sanna A.°, Dessì S.° e Pompei R.*

*Sez. Microbiologia Applicata e °Dip. Sanità Pubblica, Università di Cagliari, **Biotecne (CA).

La *Listeria monocytogenes* è un batterio G+ intracellulare, responsabile di diverse gravi infezioni umane. Gli alimenti non cotti rappresentano il maggior veicolo di trasmissione della listeriosi umana. Data la notevole importanza che riveste questo batterio nelle epidemie di origine alimentare, è diventato di importanza fondamentale il controllo rapido delle produzioni industriali per evitare un rallentamento o un'interruzione dei cicli produttivi. I metodi batteriologici classici richiedono almeno 5-7 gg per la rilevazione, la conta e l'identificazione della *L.monocytogenes*, mentre i più attuali e veloci metodi molecolari danno talvolta risultati falsi positivi o falsi negativi e comunque necessitano di un prearricchimento per aumentarne la sensibilità. Nel nostro laboratorio è stato messo a punto un nuovo metodo, semplice e rapido, che permette di effettuare un'analisi qualitativa e quantitativa della *L.monocytogenes* negli alimenti, mediante l'uso di una specifica sonda a DNA.

METODO: 1 ml di diluizioni seriali di un ceppo di collezione di *L. monocytogenes* è stato filtrato attraverso delle membrane di nylon a porosità di 0.45 µm, che sono state deposte su piastre Petri contenenti un terreno specifico ed incubate a 37°C. Dopo la crescita delle colonie, le membrane sono state trattate con una soluzione denaturante ed una neutralizzante ed infine il DNA è stato fissato con raggi UV. È stata eseguita una preibridazione di 1h ed una ibridazione di 2h a 37°C con una sonda specifica per la *L.monocytogenes* marcata con digossigenina. La successiva rilevazione colorimetrica è stata effettuata con metodi standard. Si è formato un precipitato insolubile blu-viola scuro in corrispondenza di ogni colonia di *L.monocytogenes* presente nella membrana: il numero dei precipitati corrispondeva al numero di cfu/ml del campione. Una volta validato, il metodo è stato applicato a campioni di alimenti contenenti oltre che *L.monocytogenes*, anche diverse altre specie microbiche comprese listerie non patogene per l'uomo, con risultati significativi per sensibilità (≤ 1 cfu/ml) e specificità ($\approx 100\%$).

CONCLUSIONI: Questa tecnica è di semplice e veloce esecuzione, non ha necessità di un prearricchimento e permette di avere una determinazione qualitativa e quantitativa nella ricerca di *L. monocytogenes* nei campioni alimentari entro 36 h circa.
Lavoro finanziato dalla Fondazione Banco di Sardegna.

SISTEMA RAPIDO URO-QUICK PER L'ESECUZIONE DI ANTIBIOGRAMMI: VALUTAZIONE COMPARATIVA CON IL SISTEMA KIRBY-BAUER.

Roveta S., Balistreri M.R., Marchese A., Debbia E.A.

Istituto di Microbiologia, Università di Genova.

Obiettivi: Nel periodo aprile-agosto 2002, sono stati analizzati 263 campioni di urina nosocomiali e 98 comunitari. L'antibiogramma è stato eseguito direttamente sulle urine mediante il sistema Uro-Quick e confrontato con il tradizionale Kirby-Bauer.

Metodi: Il metodo Uro-Quick consiste nel depositare 2 dischetti di antibiotico in una provetta e aggiungere 0.6 ml di urina. I campioni, dopo incubazione a 37°C per 10 minuti, sono dispensati in una provetta di brodo uro-quick e inseriti nello strumento. La lettura viene effettuata dopo 3 ore: il ceppo è considerato sensibile in assenza di sviluppo, resistente se la curva di crescita è analoga a quella del controllo senza antibiotico.

Per i campioni di provenienza nosocomiale sono stati saggiati: imipenem, nitrofurantoina, amikacina, ciprofloxacina, vancomicina, in quelli comunitari: amoxicillina/clavulanato, ceftazidime, nitrofurantoina, ciprofloxacina, fosfomicina.

In un secondo momento, utilizzando provette Uro-Quick contenenti MH brodo, sono stati saggiati su 92 ceppi nosocomiali gram-negativi amikacina, ciprofloxacina, imipenem, nitrofurantoina, piperacillina, ceftazidime e su 48 ceppi gram-positivi amikacina, vancomicina, ampicillina, ciprofloxacina.

Risultati: Sono state riscontrate concordanze superiori al 90% per vancomicina, amikacina, imipenem, fosfomicina e superiori all'80% per ciprofloxacina, nitrofurantoina e ceftazidime. Sui gram-negativi sono state ottenute identità del 100% con la fosfomicina e del 97% con ciprofloxacina e imipenem, mentre sui gram-positivi si è avuto 97% con la vancomicina, 92% con fosfomicina, amoxicillina-clavulanato e nitrofurantoina.

I risultati ottenuti con MH brodo sono stati quasi del tutto sovrapponibili a quelli ottenuti inoculando direttamente l'urina. Sono state registrate in *E. coli* coincidenze anche del 100%. Per quanto riguarda i gram-positivi, si è riscontrata con vancomicina una concordanza del 100% sia sugli Stafilococchi che sugli Enterococchi.

Conclusioni: Sulla base dei risultati ottenuti è stata riscontrata una concordanza (mediante superiore al 90%) tra antibiogramma eseguito con il sistema Kirby-Bauer e sistema Uro-Quick sui più importanti e numerosi patogeni urinari nosocomiali e comunitari (*E. coli*, Enterococco; *Klebsiella spp.* e *Proteus spp.*). Vi è quindi una grande potenzialità di utilizzo di questo sistema non solo per infezioni alle vie urinarie ma anche per quelle più gravi o per valutazioni rapide di sensibilità agli antibiotici in casi di gravi infezioni nosocomiali.

TIPIZZAZIONE MEDIANTE ANALISI IN MLST E PorA VR DI CEPPI DI *NEISSERIA MENINGITIDIS* PIU' FREQUENTEMENTE ISOLATI IN ITALIA

Stefanelli Paola, Fazio Cecilia, Neri Arianna, Mastrantonio Paola
Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica
Istituto Superiore di Sanita'- Roma

Una analisi molecolare attraverso MultiLocus Sequence Typing e PorA VR e' stata effettuata su 60 ceppi appartenenti ai 7 piu' comuni fenotipi di meningococco isolati in Italia negli anni 1994-2001. Inoltre, 5 liquidi cerebrospinali, da casi di meningite meningococcica diagnosticata mediante latex test, sono stati esaminati per verificare la validita' di queste tecniche molecolari anche quando il ceppo di *N.meningitidis* non sia disponibile.

Il protocollo utilizzato per la MLST e' quello descritto in " www.neisseria.mlst.net". La tipizzazione attraverso PorA VR typing (inclusa la VR3) e' stata messa a punto utilizzando la procedura descritta da Mölling et al., 2000.

ST 44/lineage III e' stato ritrovato tra i ceppi di meningococco con fenotipo B:14:P1.13 e B:4:P1.13. Tre diversi "sequence type" (STs) sono stati identificati ,ST40-ST42-ST1127. Tra i ceppi con fenotipo B:15:P1.7,16 , appartenenti al complex ET5, sono stati identificati l' ST32 ed il nuovo ST 1859. Tra i ceppi di sierogruppo C il fenotipo C:2a:P1.5 (ST 11) e' stato incluso nel cluster 37 insieme al nuovo ST1860 identificato anche tra i ceppi di meningococco C:2b:P1.5. L' ST 8 appartenente al complex A4 e' stato identificato tra i ceppi con fenotipo C:2b:P1.5. A nessun complex e' riconducibile l' ST 1403 ritrovato tra i ceppi B:15:P1.4. Il DNA estratto da tre dei cinque liquor esaminati e' stato classificato come ET37; i rimanenti, al lineage III. Tutti i ceppi analizzati con sierosottotipo P1.13 avevano le seguenti VRs: 7-2, 13-2, 35a. Il sottotipo P1.4 distribuito tra i ceppi B4 e B15, rappresentato dalle VRs 7-2, 4, 37. Nessuna variazione nella sequenza , eccetto per VR2, e' stata evidenziata tra i ceppi di meningococco gruppo B sierosottotipo P1.7,16 (16 oppure 16-2). I PorA tipi P1.5-2-36b e P1.5,2-1-36b sono stati identificati tra i meningococchi di sierogruppo/tipo C 2a e 2b.

In conclusione, 4 complex sono stati identificati (Lineage III, ET5;ET37;A4) tra i ceppi di meningococco isolati in Italia, analogamente a quanto descritto in altri Paesi Europei. La MLST realizzata direttamente su liquor permette una caratterizzazione molecolare completa anche in assenza dell'isolamento culturale. L'analisi delle variazioni del gene PorA ha messo in evidenza una scarsa variabilita' tra i ceppi. L'utilizzo di queste tecniche e' indispensabile per identificare , a livello dei laboratori di riferimento nazionali in Europa, la circolazione di ceppi appartenenti a lineage ipervirulenti.

ATTIVITÀ IN VITRO DI FLUOROCHINOLONI NEI CONFRONTI DEL BIOFILM PRODOTTO DA *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA*.

Giovanni Di Bonaventura ¹, Ilaria Spedicato ¹, Domenico D'Antonio ², Giovanni Catamo ¹, Raffaele Piccolomini ¹.

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

Scopo: studiare l'effetto di fluorochinoloni (ciprofloxacina, ofloxacina, norfloxacina, rufloxacina, grepafloxacina, levofloxacina, moxifloxacina), ceftazidime, e cotrimossazolo (SXT) sull'adesività e sul biofilm preformato di *Stenotrophomonas maltophilia* (SM).

Materiali e metodi: i valori di MIC di ciascun antibiotico verso 20 isolati clinici di SM sono stati determinati tramite microdiluzione in brodo. Ciascun antibiotico è stato testato a concentrazioni sub-inibenti (1/2 x, 1/4 x ed 1/8 x MIC) per valutare, tramite tecnica spettrofotometrica, l'effetto sull'adesività di SM in pozzetti di micropiastre in polistirene: una sospensione batterica (10⁶ cfu/ml) in TSB è stata incubata a 37°C per 24h in assenza (controllo) od in presenza di antibiotico. Al fine di valutare l'effetto degli antibiotici testati sul biofilm preformato da SM, dopo 24h di incubazione in assenza di antibiotico a 37°C la sospensione è stata aspirata ed il pozzetto veniva lavato con PBS sterile. Il biofilm così formatosi veniva dunque esposto per 6h a concentrazioni pari a 50 µg/ml, 100 µg/ml e 500 µg/ml di antibiotico. TSB senza antibiotico veniva aggiunto ai pozzetti di controllo.

Risultati: concentrazioni sub-inibenti dei fluorochinoloni riducevano l'adesione di SM al 54-67% (1/2 x MIC), 68-75% (1/4 x MIC) e 75-88% (1/8 x MIC), rispetto al controllo. Ciprofloxacina e norfloxacina risultano essere le molecole più attive; ceftazidime e SXT quelle dotate di minore efficacia. L'esposizione di elevate concentrazioni di fluorochinoloni al biofilm preformato diminuisce l'adesività di SM al 70-84% (50 µg/ml), 64-85% (100 µg/ml) e 27-79% (500 µg/ml), rispetto al controllo. In particolare, moxifloxacina (500 µg/ml) riduce al 27.5% l'adesività di SM; ceftazidime e SXT risultano essere gli antibiotici dotati di minore attività. Le osservazioni in microscopia elettronica a scansione depongono a favore dell'azione inibente dei fluorochinoloni sulla produzione di glicocalice (slime) da parte di SM.

Conclusioni: contrariamente a ceftazidime e SXT, l'impiego di fluorochinoloni a concentrazioni sub-inibenti inibisce in maniera dose-dipendente la produzione di slime e, conseguentemente, l'adesione di SM a materiale plastico. Inoltre, elevate concentrazioni di fluorochinoloni riducono massivamente il biofilm preformato, suggerendo che tale classe di antibiotici potrebbe essere considerata nella prevenzione o nel trattamento di infezioni biofilm-associate sostenute da SM.

RESISTENZA ALLA CLARITROMICINA DI *H. PYLORI*: DIAGNOSI RAPIDA IN CAMPIONI FECALI

Fontana C.^{1,2}, Favaro M.¹, Minelli S.¹, Capalbo F.¹, E.S. Pistoia², Marino D.², Pietroiusti A.³, Galante A.³, Favalli C.^{1,2}.

1 Laboratori di Microbiologia Clinica Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico Tor Vergata viale Oxford 81 – Roma

2 Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche - Università degli Studi di Roma Tor Vergata Via Montpellier 1 Roma

3 Dipartimento di Medicina Interna - Università degli Studi di Roma Tor Vergata Via Montpellier 1 Roma.

La resistenza di *Helicobacter pylori* verso la claritromicina oscilla fra lo 0-15% con punte più elevate nei paesi industrializzati ove l'uso dei macrolidi è più comune. Questo aspetto ha un impatto notevole sulle terapie eradicanti soprattutto in considerazione del fatto che la claritromicina rappresenta un farmaco di scelta elettiva. La problematica è così sentita che nel corso degli anni sono state numerose le pubblicazioni internazionali sullo studio dei meccanismi di resistenza verso i macrolidi che erano alla base dell'insuccesso di terapie eradicanti contro *H. pylori*. I risultati di questi lavori hanno condotto alla conclusione che la resistenza ai macrolidi in *H. pylori*, ed in particolare per la claritromicina, sono essenzialmente dovuti a mutazioni puntiformi (siano esse transizioni o trasversioni) nella sequenza dell'rRNA 23S; mentre sono stati esclusi vari altri meccanismi quali la presenza di metilasi del RNA o di pompe d'efflusso. Sembra ormai accertato che una qualunque mutazione del 23S rRNA porta ad una mutazione della conformazione del ribosoma e quindi ad una inefficace interazione di questo con il macrolide. Alcune di queste mutazioni sembrano essere associate con un fenotipo di resistenza ad alto livello, come quelli che interessano il dominio funzionale II di *H. pylori*, altre, tra cui quella descritta in un nostro recente lavoro, sono associate a fenotipo di resistenza a basso livello interessando il VI dominio funzionale. Tali mutazioni, causando una modificazione della sequenza genica sono anche responsabili della formazione di siti di restrizione che consentono una differenziazione netta dei fenotipi mutati rispetto al wild type. Fino ad oggi, tuttavia, l'analisi di restrizione è stata pur sempre condotta su campioni di DNA estratto da stipiti in coltura che a loro volta derivavano dalla coltivazione di frammenti di mucosa gastrica ottenuti attraverso gastroscopia. Quest'ultima pur essendo nell'algoritmo diagnostico di *H. pylori* il "gold Standard", non è scevra di una serie di controindicazioni. Scopo del nostro lavoro è stato quello di mettere a punto una tecnica di amplificazione molecolare di un frammento del 23S rRNA direttamente dai campioni fecali dei pazienti risultati a precedenti indagini *H. pylori*-positivi. La tecnica si avvale di amplificazione preliminare direttamente da campione biologico e di una successiva analisi di restrizione degli ampliconi ottenuti allo scopo di evidenziare pattern di restrizione già noti (come quello *MboI* che riguarda le mutazioni in posizione 2142/3) o da noi descritti come la transizione T2717C con sito di restrizione *HhaI*. I risultati ottenuti su un vasto numero di campioni fecali, mostrano l'efficacia diagnostica del nostro metodo, apprezzabile anche per la sua rapidità e per la sua economicità.

UN CEPPO MUTANTE DI *MYCOBACTERIUM BOVIS* BCG, MANCANTE DEL GENE PER LA PROTEINA DI SECREZIONE SA5K, PRESENTA UNA RIDOTTA CAPACITÀ DI CRESCITA IN MACROFAGI UMANI RISPETTO AL CEPPLO PARENTALE

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

Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia

Università degli Studi di Pisa

Una proteina di secrezione di *M. tuberculosis/M. bovis* BCG di 8.3 kDa, chiamata SA5K, è stata precedentemente identificata e caratterizzata nel nostro laboratorio. L'analisi della sequenza genica codificante per la proteina non ha evidenziato un'omologia significativa con alcuna proteina a funzione nota e, pertanto, il ruolo fisiologico di SA5K è, al momento, sconosciuto. Nel presente studio, allo scopo di valutare l'eventuale ruolo di SA5K nella virulenza, è stato allestito un ceppo mutante di *M. bovis* BCG mediante l'inserimento del gene per la resistenza alla kanamicina (*aph*) nella sequenza genica codificante per la proteina. La distruzione del gene SA5K è stata confermata mediante *Southern blot* utilizzando rispettivamente sonde specifiche per il gene integro o per la cassetta *aph*. Inoltre, l'analisi mediante *Western blot* dei filtrati di coltura del ceppo mutato (BCG *sa5k::aph*) con un anticorpo monoclonale specifico per la proteina ha confermato che la distruzione del gene si accompagna alla mancata produzione della relativa proteina. Allo scopo di valutare se tale distruzione alterasse la crescita intracellulare di BCG, monostrati macrofagici umani, ottenuti da donatori sani, venivano infettati con il ceppo mutato e quello parentale ad una molteplicità di infezione di 1 batterio per 10 cellule. Dopo 3 ore di fagocitosi, nessuna differenza è stata rilevata tra i due ceppi nel numero di batteri intracellulari recuperati mediante lisi delle cellule infettate, indicando che la distruzione del gene SA5K non influenza l'efficienza di fagocitosi. Al contrario, nella maggior parte dei donatori analizzati, BCG *sa5k::aph* ha mostrato una ridotta capacità di crescita rispetto al ceppo wild type come indicato dal più basso numero di CFU ottenute dai monostrati infetti a 2, 4 e 6 giorni dall'infezione. L'attivazione dei macrofagi mediante pretrattamento con LPS e IFN- γ non ha significativamente influenzato la cinetica di crescita intracellulare sia del ceppo mutato sia di quello parentale. Tali risultati suggeriscono un ruolo della proteina SA5K nella crescita intracellulare di BCG.

ASPETTI MOLECOLARI DELL'ACIDO RESISTENZA IN *LISTERIA MONOCYTOGENES*

M. P. Conte^a, C. Longhi^a, M. Penta^a, G. Petrone^a, A. M. Di Biase^a, A. Tinari^b, F. Superti^b, G. Fabozzi^c, P. Visca^{c,d}, L. Seganti^a

^aDip. Scienze di Sanità Pubblica, Università «La Sapienza», ^bLab. Ultrastrutture, Istituto Superiore di Sanità, ^cUnità di Microbiologia Molecolare, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive IRCCS «L. Spallanzani», ^dDip. Biologia, Università Roma Tre, Roma.

Listeria monocytogenes, patogeno intracellulare facoltativo a trasmissione oro-fecale, è capace di percepire e rispondere prontamente ai cambiamenti fisico-chimici, che incontra durante il passaggio dall'ambiente all'ospite. I batteri devono superare, infatti, l'attacco dei protoni nei vari stadi della colonizzazione e/o dell'infezione. Dopo l'ingestione, essi possono persistere nello stomaco a pH<3 per circa 2 ore, prima di raggiungere l'intestino, e poi nell'ambiente intestinale devono contrastare gli effetti deleteri degli acidi grassi volatili che si formano durante la fermentazione degli zuccheri; devono, infine, resistere all'attacco dei macrofagi. *L. monocytogenes* ha sviluppato una risposta acido-tollerante (ATR) che rappresenta un insieme di eventi, indotti dalla crescita in ambiente moderatamente acido, il cui risultato consiste nella protezione della cellula batterica ad una successiva esposizione ad un pH letale. I determinanti molecolari, coinvolti nella reattività al basso pH ed il comportamento intracellulare dei batteri pre-esposti all'acido non sono ancorabene identificati. In questa ricerca sono state studiate, in batteri acido-adattati, sia l'espressione di geni che codificano determinanti coinvolti nel processo invasivo e nell'acido resistenza, sia la sopravvivenza intracellulare nella linea macrofagica umana THP-1, attivata con interferone gamma. I risultati ottenuti hanno dimostrato un'aumentata sopravvivenza di *L. monocytogenes* nei macrofagi e tale effetto è stato associato ad un alterato quadro dell'espressione di geni coinvolti nell'acido resistenza e nell'invasione cellulare. La trascrizione del gene *plcA*, che codifica una fosfolipasi C, è risultata significativamente ridotta. Tale effetto è dovuto alla riduzione nella quantità del trascritto policistronico *prfA-plcA* ed all'aumento del messaggero monocistronico di *prfA*. Al contrario i geni *sod* e *gad* che codificano, rispettivamente, una superossidodismutasi citoplasmatica e le isoforme della glutammico decarbossilasi sono risultati positivamente regolati a basso pH. Indagini di microscopia elettronica hanno documentato l'aumentata sopravvivenza e moltiplicazione di *Listeria* sia nei vacuoli che nel citoplasma dei macrofagi infettati.

Ricerca finanziata con fondi MIUR, PRIN 2000.

BACILLUS THURINGIENSIS: UN OPPORTUNISTA EMERGENTE

E. Ghelardi, F. Celandroni, E. Parisio, S. Salvetti, E. Fiscarelli*, M. Campa, S. Senesi

Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, Università degli Studi di Pisa, *Unità di Batteriologia, Ospedale Bambin Gesù, Roma

Bacillus thuringiensis è un microrganismo largamente diffuso nell'ambiente come biopesticida, in quanto capace di produrre inclusioni cristalline ad attività insetticida specifica. Nonostante *B. thuringiensis* sia ritenuto non patogeno per l'uomo, recentemente è stato isolato da sporadiche infezioni di varia natura e gravità.

Il presente studio ha preso origine dal ripetuto isolamento di *B. thuringiensis* da emocolture di uno stesso paziente immunocompromesso, sofferente di una grave patologia polmonare. La genotipizzazione dei ceppi isolati ha permesso di dimostrare che essi costituivano un unico stipite microbico; l'identità molecolare dei ceppi suggeriva, inoltre, l'esistenza di un focolaio infettivo persistente localizzato, probabilmente, a livello polmonare. Mediante l'impiego di un modello murino d'infezione intratracheale, allestito nel corso di questa indagine, è stato possibile dimostrare che *B. thuringiensis* produce infezione polmonare a cui segue disseminazione sistemica ed è stata determinata per tale ceppo una DL₅₀ pari a $1.8 \pm 0.1 \times 10^6$. Allo scopo di valutare il ruolo delle fosfolipasi ed emolisine prodotte da *B. thuringiensis*, il modello d'infezione intratracheale nel topo è stato utilizzato per comparare due ceppi isogenici di *B. thuringiensis*, di cui uno produttore di un'ampia varietà di fattori di virulenza e l'altro, ottenuto per mutagenesi inserzionale (1), incapace di secernere tali tossine. È stato, così, possibile dimostrare che le fosfolipasi e le emolisine prodotte da *B. thuringiensis* contribuiscono alla patogenicità di questo microrganismo, almeno nel modello sperimentale di infezione utilizzato, con una differenza significativa nel valore di DL₅₀ per essi calcolato pari a $3.9 \pm 0.4 \times 10^5$ e a $1.2 \pm 0.2 \times 10^7$ cellule, rispettivamente. È stato dimostrato, inoltre, che cariche infettanti pari ad 1/100 della DL₅₀ sono letali per il 100% degli animali trattati con ciclofosfamida, sottolineando l'importanza dei neutrofili nel controllo di infezioni polmonari sostenute da *B. thuringiensis*. I risultati ottenuti suggeriscono, pertanto, che sia una diversa virulenza del ceppo infettante che una ridotta reattività immunitaria dell'ospite abbiano un ruolo determinante nell'instaurarsi di infezioni causate da *B. thuringiensis*.

(1) E. Ghelardi, F. Celandroni, S. Salvetti, D.J. Beecher, M. Gominet, D. Lereclus, A.C.L. Wong, S. Senesi. J. Bacteriol. (in corso di stampa).

ATTIVITÀ DELLA β -DEFENSINA UMANA 3, DA SOLA O IN COMBINAZIONE CON ALTRI AGENTI ANTIMICROBICI, VERSO BATTERI PATOGENI DEL CAVO ORALE

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

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

Le defensine sono dei piccoli peptidi cationici, prodotti da una varietà di tessuti sia dell'uomo che degli animali, che per la loro spiccata attività antimicrobica vengono considerati importanti molecole effettrici dell'immunità naturale. Sulla base di caratteristiche strutturali si distinguono nell'uomo 6 α -defensine e 3 β -defensine. La β -defensina umana 3 (hBD3) è stata isolata molto recentemente da lesioni cutanee di pazienti con psoriasi. La presenza dell'mRNA per l'hBD3 è stata, tra l'altro, rilevata nelle cellule epiteliali del cavo orale e nelle ghiandole salivari, suggerendo un ruolo di tale peptide nella difesa del cavo orale verso infezioni batteriche.

Scopo del presente studio è stato quello di valutare, mediante l'impiego di un saggio di batteriocidia: i) l'attività antimicrobica dell'hBD3 verso batteri patogeni del cavo orale ritenuti tra i maggiori responsabili di lesioni cariose (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus sanguis*) o coinvolti nelle malattie parodontali (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*); ii) l'eventuale attività sinergica dell'hBD3 con alcuni farmaci di comune impiego nella terapia delle infezioni del cavo orale come l'amoxicillina, il metronidazolo e la clorexidina o con molecole naturali ad attività antibatterica normalmente presenti nella saliva, come il lisozima. I risultati ottenuti hanno dimostrato che, sebbene l'hBD-3 sia risultata battericida verso tutte le specie batteriche saggiate, i diversi microrganismi hanno mostrato gradi diversi di suscettibilità come indicato dai valori di MBC (minima concentrazione battericida) che variavano da 2 μ g/ml per *S. mutans* a 100 μ g/ml per *P. gingivalis*. Il peptide ha, inoltre, mostrato una spiccata attività sinergica battericida verso *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *S. mutans* quando utilizzato in associazione con alcuni dei farmaci testati. Per alcune combinazioni di peptide/farmaco tale attività sinergica battericida risultava evidente già dopo 60 min. di incubazione e permetteva di ridurre di almeno 4 volte la quantità di farmaco necessaria per ottenere un effetto battericida.

Tali risultati indicano un effetto sinergico tra un peptide naturale e farmaci ad attività antimicrobica e suggeriscono un possibile impiego della hBD-3 nella terapia locale delle infezioni del cavo orale.

ORGANIZZAZIONE DI GENI DELLA MOTILITÀ FLAGELLARE ED IDENTIFICAZIONE DI UN NUOVO GENE IN *BACILLUS CEREUS*

Sara Salvetti, Francesco Celandroni, Emilia Ghelardi, Sonia Senesi

Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, Università degli Studi di Pisa, Via S. Zeno 35/39, 56127 Pisa.

Bacillus subtilis è considerato un modello per lo studio della motilità nei batteri Gram-positivi. Recenti studi hanno dimostrato, però, che microrganismi appartenenti al gruppo *Bacillus cereus* differiscono sostanzialmente da *B. subtilis* sia per l'organizzazione cromosomica di alcuni geni flagellari (1) che per la funzione di proteine coinvolte nella motilità. È stato dimostrato, in particolare, che una mutazione nel gene *fliY* dà origine in *B. cereus* ad un fenotipo flagellato e mobile (2) mentre tale gene è necessario, in *B. subtilis*, per il corretto assemblaggio dei flagelli, in quanto codifica per una proteina del complesso di *switch* flagellare. Nell'ambito di una ricerca volta a meglio caratterizzare i meccanismi molecolari che regolano la motilità flagello-mediata in *B. cereus*, è stata studiata l'organizzazione genomica di alcuni geni flagellari sia strutturali che regolatori comparativamente a quella di *B. subtilis*. Tale indagine ha evidenziato che alcuni dei geni flagellari analizzati sono diversamente localizzati nel cromosoma delle due specie microbiche mentre esiste notevole omologia nelle sequenze nucleotidiche di alcuni di essi. Inoltre, l'analisi delle ORF presenti nella regione genomica studiata ha portato alla dimostrazione che in *B. cereus* è presente un nuovo gene, in parte omologo a *fliY* di *B. subtilis* ed in parte (nella porzione C-terminale) a *fliN* dei batteri Gram-negativi. Viene avanzata l'ipotesi che questo nuovo gene, da noi denominato *fliY/N*, potrebbe codificare per una addizionale proteina del complesso di *switch*, dando ragione del fenotipo flagellato e mobile del mutante *fliY* di *B. cereus*. Esperimenti di knock-out genico di *fliY* e *fliY/N*, attualmente in corso, potrebbero chiarire il ruolo di *fliY/N* nell'assemblaggio e nella rotazione flagellare in *B. cereus*.

(1) F. Celandroni, E. Ghelardi, M. Pastore, A. Lupetti, A.-B. Kolstø, S. Senesi. FEMS Microbiol. Lett. 190:247-253, 2000.

(2) E. Ghelardi, F. Celandroni, S. Salvetti, D.J. Beecher, M. Gominet, D. Lereclus, A.C.L. Wong, S. Senesi. J. Bacteriol. (in corso di stampa).

EFFETTI CLINICI E MICROBIOLOGICI SUI TESSUTI GENGIVALI ADIACENTI A LESIONI DI V CLASSE RESTAURATI CON DIFFERENTI MATERIALI.

S. D'Ercole¹, M. Paolantonio², G. Catamo¹, D. Tripodi², G. Perinetti², R. Piccolomini¹

Dipartimenti di ¹Scienze Biomediche, Sez. di Microbiologia e di ²Discipline Odontostomatologiche, Università "G. d'Annunzio" Chieti

Nella terapia delle lesioni cervicali o V classi è necessario utilizzare un materiale che si adatti perfettamente ai margini della preparazione, non causi infiltrazione marginale e danni al parodonto.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare i cambiamenti clinici e microbiologici causati, sul parodonto, da restauri sottogengivali in materiale composito, cemento vetro-ionomerico ed amalgama. Sono stati selezionati 16 pz presentanti ciascuno 4 difetti cervicali di abrasione/erosione, con margine sottogengivale, in 4 denti adiacenti nella zona posteriore del cavo orale. I pz sono stati sottoposti ad una seduta di igiene orale professionale e di istruzione di igiene domiciliare. Dopo 4 settimane sono stati eseguiti, in una unica seduta, i restauri in tre lesioni rispettivamente in composito, CVI ed amalgama. I pz sono stati controllati prima dell'esecuzione del restauro (T0), dopo 30 giorni (T1), 60 gg (T2) e 180 gg (T3), con motivazione all'igiene rinnovata ad ogni visita. Ogni seduta ha comportato l'esame clinico, con rilevazione degli indici clinici: indice di placca (PI), profondità di sondaggio (PD), sanguinamento al sondaggio (BOP) e il prelievo microbiologico. Quest'ultimo è stato processato per definire la carica: totale, di aerobi Gram positivi e anaerobi Gram negativi e l'analisi quali-quantitativa delle specie anaerobiche. Clinicamente non sono state rilevate modificazioni statisticamente significative nel numero di siti positivi per PI e di GI né nella PD, indipendentemente dalla presenza di un restauro e dal tipo di materiale usato.

L'analisi microbiologica non ha rilevato cambiamenti statisticamente significativi nella conta batterica nei restauri in amalgama, CVI e controllo. Al contrario, nel gruppo composito, è stato evidenziato un significativo decremento degli aerobi associato ad un aumento degli anaerobi. Analizzando in particolare la composizione della placca batterica nessun cambiamento nelle proporzioni dei diversi microrganismi è stato osservato in amalgama e controllo. Nella placca adiacente a restauri in CVI, passando da T0 a T3, si assiste ad un incremento di *B. capillosus* e *P. oralis*. La presenza di compositi determina invece un decremento di *S. salivarius* ed un incremento di *A. israelii*, *S. mitis*, *B. capillosus*, *P. oralis*, *F. nucleatum* e *P. gingivalis*. Questi risultati sono rilevanti se si tiene conto che *F. nucleatum* e *P. gingivalis* sono considerati putativi parodontopatogeni e probabilmente derivanti dalla formazione di un micro-gap tra dente e composito, favorente la crescita di batteri anaerobi. Si evidenzia, quindi, il ruolo determinante del Laboratorio di Microbiologia Clinica anche in campo odontoiatrico.

IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DI BIFIDOBATTERI DI UN PREPARATO PROBIOTICO ED EFFETTI IMMUNOMODULATORI DEL LORO DNA GENOMICO

Patrizia Brigidi, Beatrice Vitali, Federica Federici, Karen Lammers¹ e Diego Matteuzzi

¹Dip. Medicina Interna e Gastroenterologia, Dip. Scienze Farmaceutiche, Università di Bologna, Via Belmeloro 6, 40126 Bologna. Tel: 051-2099743, Fax: 051-2099734, e-mail: patbri@alma.unibo.it

I bifidobatteri rappresentano uno dei più importanti gruppi microbici intestinali nell'uomo e nell'animale e per la loro attività probiotica sono largamente impiegati nell'industria farmaceutica e alimentare. Per l'identificazione specifica dei ceppi di *Bifidobacterium* (*B. infantis* BI07, *B. breve* BBSF e *B. longum* BL04) di un nuovo preparato probiotico (VSL#3), sono stati progettati 3 set di primer basati sulle sequenze 16S e 16S-23S del DNA ribosomale. La disponibilità di questi primer ha consentito di quantificare *B. infantis* BI07 e *B. breve* BBSF in campioni fecali di pazienti con colite ulcerosa e paucite trattati con VSL#3. Dopo una settimana di assunzione, tutti i pazienti presentavano un incremento della popolazione bifida, mentre dopo 10 giorni dalla sospensione del trattamento i valori ritornavano a quelli iniziali. Durante la somministrazione del probiotico è stata evidenziata la presenza di *B. infantis* e *B. breve* nel 70 e 50% dei pazienti trattati; solo il 20% presentava colonizzazione da parte di entrambi i ceppi.

Recentemente è stato osservato l'effetto immunostimolante di sequenze non metilate di DNA (CpG motif), presente specie nei batteri. Considerando l'alto GC% del DNA genomico dei bifidobatteri, si è studiato l'effetto del DNA dei 3 ceppi sopra indicati sulla secrezione, in PBMC, di interleuchine proinfiammatorie, quali IL-1 e IL-6, e antiinfiammatorie, quale IL-10. I DNA genomici di *B. breve* BBSF e *B. infantis* BI07 sono risultati gli induttori più potenti per la produzione di IL-10. È stato inoltre saggiato il potenziale effetto immunomodulante del DNA batterico totale isolato da feci di volontari sani, prima e dopo il trattamento con VSL#3. Si è osservato che prima del trattamento il DNA batterico fecale induceva livelli di IL-1 più elevati rispetto a quelli di IL-10, mentre, dopo trattamento probiotico, la secrezione di IL-10 aumentava e diminuiva quella di IL-1.

È stato quindi messo a punto un sistema molecolare per differenziare i bifidobatteri esogeni da quelli endogeni e di studiarne le cinetiche di colonizzazione intestinale. Inoltre si è dimostrato un effetto immunomodulatorio del DNA di questi ceppi probiotici che può essere coinvolto nella risposta immune indotta dal microbiota a livello intestinale.

OSSERVAZIONI SUI MEDIATORI DELL'AZIONE PATOGENA DI *EHRlichIAE*.

D. Fumarola, L. Fumarola, O. Brandonisio

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

Mentre le segnalazioni relative all'incidenza delle Ehrlichiosi umane, sia granulocitaria (HGE) che monocitica (HME) sono in incremento, non altrettanto può dirsi per le acquisizioni sui possibili mediatori, diretti ed indiretti, del danno all'ospite. Per quanto concerne i prodotti tossici, trattandosi di microrganismi Gram negativi, il lipopolisaccaride endotossico, ovviamente, dovrebbe essere preso nella dovuta considerazione. In realtà, peraltro, nei casi severi spesso letali e/o con danno multisistemico e documentata batteriemia, anche in recenti indagini (SEFDAR et al. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8:320) non risulta sia stata ricercata la presenza di una possibile endotossiemia. Anche per quanto concerne l'endotossicità dei singoli batteri (verificata col Limulus assay e col test pirogeno) non si ha conoscenza di indagini in tal senso: per quanto discutibile, l'impiego di preparazioni batteriche da colture cellulari (DH 82, HL 60, P388D1) ci ha consentito di rilevare una bassa potenza endotossica (carattere comune, del resto, a molte specie della famiglia Rickettsiaceae). D'altro canto l'uso di infected cells, in comparazione come controllo con uninfected cells, è servito nelle mani di altri studiosi (PUSTERLA N. et al: *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 1276) per una ricerca di patologia sperimentale sull'animale nell'intento di verificare, anche per le Ehrlichiae, uno dei postulati di Koch. Del tutto di recente (2002) utilizzando sospensioni batteriche cell-free, Lin e Rikihisi hanno comunicato (102nd A.S.M. General Meeting, abstract D.120) una significativa riduzione del burst respiratorio dei fagociti esposti a *E. chaffeensis* (omologo dell'agente della HME): ciò spiegherebbe, come dimostrato per altri patogeni intracellulari sia obbligati (*Rickettsie*) che facoltativi (*Brucelle*, *Legionelle*), la capacità di sopravvivenza e di replicazione delle *Ehrlichiae*. Ulteriori indagini condotte con queste preparazioni cell free (preferibili comunque alle proteine ricombinanti impiegate nella diagnostica sierologica) potranno contribuire ad una migliore definizione delle problematiche relative ai complessi meccanismi patogenetici delle Ehrlichiosi.

VACCINAZIONE ANTI-IDIOTIPICA A DNA PER L'INDUZIONE DI ANTICORPI DIRETTI CONTRO IL POLISACCARIDE DI BATTERI CAPSULATI

C. Beninati*, G. Mancuso*, A. Midiri*, G. Tomaselli*, D. Marcuccio*, A. Miceli*, L. Polonelli** e G. Teti*.

Dipartimento di Patologia e Microbiologia Sperimentale – Università di Messina - Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio - Università di Parma**.*

Studi precedenti hanno dimostrato che frammenti anticorpali anti-idiotipici a catena singola (scFv) possono replicare le caratteristiche immunologiche di polisaccaridi. In questi studi sono stati utilizzati anticorpi monoclonali diretti contro alcuni epitopi protettivi della capsula di streptococchi o meningococchi di gruppo B per selezionare scFv anti-idiotipici, in grado cioè di reagire contro determinanti antigenici dei domini variabili dell'anticorpo protettivo. Tali scFv si sono dimostrati capaci di competere con i rispettivi polisaccaridi capsulari per il legame ad anticorpi specifici prodotti in specie animali diverse. Inoltre, gli scFv erano in grado, dopo immunizzazione, di indurre nel topo la produzione di anticorpi anti-idiotipici. Allo scopo di incrementare l'attività protettiva di queste immunizzazioni, sono stati messi a punto protocolli per la vaccinazione a DNA. Sono stati costruiti, a questo fine, plasmidi denominati GT2 e GT4 comprendenti: 1) porzioni "immunostimolatorie" composte da sequenze GpC in grado di indurre citochine proinfiammatorie; 2) enhancer/promoter di Citomegalovirus; 3) sequenza codificante per l'scFv seguita da coda di poli-adenina; 4) geni codificanti fattori di resistenza all'ampicillina e alla neomicina. I plasmidi venivano utilizzati per trasfettare fibroblasti di rene di scimmia (COS-7) e per immunizzare topi BALB/c di 8 settimane per via intramuscolare. L'scFv era espresso in cellule COS-7, come indicato da un test immuno-enzimatico eseguito su lisati cellulari. Inoltre l'immunizzazione con plasmidi determinava significativi incrementi di titolo anticorpale diretto contro il polisaccaride capsulare di meningococco di gruppo B. L'analisi delle sottoclassi indicava che la risposta era soprattutto di tipo Th-1 come indicato da una predominanza delle IgG2a. Questi risultati indicano che l'immunizzazione con DNA è suscettibile di incrementare le risposte anticorpali indotte da scFv anti-idiotipici. L'induzione di IgG2a, verosimilmente riconducibili alla presenza di sequenze immunostimolatorie, è di particolare interesse dal momento che i polisaccaridi capsulari non sono in grado di indurre IgG2a anche dopo coniugazione con proteine.

LA TOSSINA DELLA PERTOSSE É UN POTENTE ADIUVANTE CAPACE, IN SINERGISMO CON LPS, DI INDURRE IL-12 ED INTERFERON-GAMMA IN CELLULE DENDRITICHE UMANE.

Clara M. Ausiello, Giorgio Fedele, Francesca Urbani, Raffaella Palazzo, Fabiana Spensieri e Antonio Cassone.

Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica,

Istituto Superiore di Sanità,

Viale Regina Elena 299, 00161 Roma, Italia.

E' stata studiata la capacità della tossina della pertosse (PT) di agire come adiuvante nell'induzione della maturazione e delle attività funzionali di cellule dendritiche (DC) derivate da monociti umani. Sia la PT nativa (nPT) che la PT geneticamente detossificata (dPT) sono in grado di promuovere l'espressione di molecole costimolatorie e di antigeni differenziativi in cellule DC immature. L'inattivazione al calore abolisce la capacità della PT di indurre tale maturazione, suggerendo che l'azione della PT non é addebitabile ad eventuali contaminanti. DC maturate in seguito all'esposizione alla PT sono in grado di stimolare la presentazione di antigeni alloreattivi ed inoltre sono in grado di produrre un vasto spettro di citochine pro-infiammatorie e regolatorie. In particolare la nPT e la dPT inducono la produzione di IFN-gamma e di bassi livelli o assenza di IL-10, citochine che rispettivamente orientano la risposta immune (RI) verso un profilo Th1 o Th2. La produzione di IFN-gamma é stata confermata dalla colorazione intracitoplasmatica che ha evidenziato la presenza di IFN-gamma in una piccola percentuale di DC CD1a positive. E' di particolare rilievo inoltre che sia la nPT che la dPT hanno una azione sinergica con LPS nella produzione di IL-12. Un aumento nella velocità di produzione piuttosto che del numero di cellule produttrici é responsabile dell'accumulo di IL-12 nei terreni di coltura. DC maturate in presenza di LPS e PT sono in grado di indurre IFN-gamma ma non IL-4 in linfociti T naive, promuovendo così una chiara polarizzazione Th1 della RI. Sia la polarizzazione Th1 che la presentazione di allo-antigeni sono inibiti da anticorpi anti-IL-12. Pertanto, la nPT oltre a ad essere importante nell'induzione di risposte specifiche (ad esempio nella vaccinazione contro la pertosse) é un potente adiuvante Th1 e che tale adianza é mantenuta dalla detossificazione genetica, rendendo quindi la dPT un adiuvante Th1 potenzialmente utilizzabile in vivo anche nell'uomo. Inoltre l'evidenza che le DC sono in grado di produrre IFN-gamma, anche se a bassi livelli, conferma ulteriormente il loro ruolo critico nella regolazione della RI.

TRASMISSIBILITÀ DELL'INFEZIONE DA PARVOVIRUS B19 TRAMITE EMOERIVATI: RISULTATI DI UNO STUDIO PROSPETTICO A LUNGO TERMINE IN EMOFILICI TRATTATI SOLO CON FATTORI "RICOMBINANTI".

A. Azzi, ¹M. Morfini, K. Zakrzewska, ²R. Musso, ³E. Santagostino, ⁴G. Castaman.

Dipartimento di Sanità Pubblica, Università di Firenze; ¹Dipartimento di Ematologia, Centro per l'Emofilia, Azienda Ospedaliera Careggi, Firenze; ²Dipartimento di Ematologia, Centro per l'Emofilia, Ospedale Ferrarotto, Catania; ³Centro per l'Emofilia e Trombosi A. Bianchi Bonomi, IRCCS Maggiore Hospital e Università di Milano; ⁴Dipartimento di Ematologia, Centro per l'Emofilia, Ospedale San Bortolo, Vicenza.

I concentrati di fattori della coagulazione VIII e IX, anche dopo l'introduzione di trattamenti chimici e fisici, efficaci per l'inattivazione di molti virus (quali HIV, HCV, HBV), risultano, da molti studi, ancora in grado di trasmettere l'infezione da parvovirus umano B19, che ha rivelato in queste circostanze la sua notevole resistenza. Gli stessi fattori ottenuti mediante tecniche di ricombinazione del DNA (rhFVIII/IX) dovrebbero essere "per definizione" privi di contaminazioni da virus umani. Alcuni dati della letteratura sembrano tuttavia mettere in dubbio tale sicurezza, in particolare per quanto riguarda rhFVIII/IX di prima generazione, ai quali viene aggiunta albumina umana come stabilizzante. Allo scopo di chiarire il rischio di trasmissione dell'infezione da virus B19 da parte di rhFVIII/IX abbiamo condotto uno studio prospettico a lungo termine in 22 pazienti affetti da emofilia A/B e sottoposti a uno o più trattamenti con tali prodotti sia di prima che di seconda generazione (cioè senza l'aggiunta di proteine umane). In tali pazienti, che erano privi di anticorpi anti-B19 in partenza, non si è osservata alcuna sieroconversione nei confronti del parvovirus nei primi 2,5 anni di follow up, nonostante l'entità elevata dei trattamenti. Successivamente si sono avute due sieroconversioni nei confronti del parvovirus, non diversamente da quanto rilevabile nella popolazione normale. Questo studio sembra quindi dimostrare che rhFVIII/IX sia di prima che di seconda generazione sono sicuri per quanto riguarda il rischio di trasmissione del virus B19.

BLOCCO DELL'ATTIVITÀ ENHANCER DEL VIRUS DELL'EPATITE B (HBV) DA UNA SEQUENZA DI DNA DI *PARACENTROTUS LIVIDUS* CON PROPRIETÀ DI ISOLATORE CROMATINICO.

¹Bonura C., ²Cascio S., ²Di Simone P., ¹Ferraro D., ¹Di Stefano R., ³Craxì A., ²Spinelli G.

¹Dipartimento di Igiene e Microbiologia, Università degli Studi di Palermo;

²Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università degli Studi di Palermo;

³Cattedra di Gastroenterologia, Istituto di Clinica Medica, Università degli Studi di Palermo.

Gli analoghi nucleosidici non ottengono una inibizione della trascrizione del HBV-DNA integrato. Abbiamo quindi valutato la possibilità di bloccare gli *enhancers* di HBV mediante l'elemento di confine cromatinico *sns* (*silencing nuclear sequence*) del gene H₂A degli istoni del riccio di mare *Paracentrotus Lividus*, di cui è stata dimostrata una attività inibitoria su *enhancers* e *promoters* eterologhi.

Sono state generate costruzioni plasmidiche contenenti l'enhancer I o II di HBV, transfettate poi *in transient* individualmente in colture di epatociti umani neoplastici (HuH7). L'espressione del gene *reporter* (*Enhanced Green Fluorescent Protein*, EGFP) è stata valutata in fluorescenza nelle costruzioni contenenti le unità trascrizionali.

Le cellule transfettate con le costruzioni contenenti gli *enhancers* di HBV a monte del promotore eterologo *tk* esprimevano una intensa EGFP positività, indicando una espressione attiva del gene *reporter*. Negli epatociti transfettati con *sns* posto tra *enhancer* e *promoter*, la EGFP era nettamente ipoespressa, per interferenza fra *sns* ed espressione del *reporter*. La fluorescenza si manteneva intensa anche nelle cellule transfettate con una sequenza spaziatrice al posto di *sns*, dimostrando che l'aumento della distanza tra *enhancer* e *promoter* non interferisce con l'espressione del *reporter*. È importante sottolineare che la intensità di fluorescenza nelle cellule transfettate con le costruzioni contenenti *sns* era sovrapponibile a quella degli epatociti transfettati con il solo *promoter*, confermando che anche per l'HBV la presenza di *sns* blocca l'attività degli *enhancers* riportando l'espressione del gene *reporter* al livello basale.

L'analisi di diversi cloni di cellule HuH7 stabilmente transfettate con le varie costruzioni plasmidiche ha confermato che l'*sns* mantiene la funzione di "enhancer blocker" anche dopo l'integrazione nel DNA genomico di epatociti umani *in vitro*.

RUOLO DELLE IgM anti-HCV NELLA DIAGNOSI DIFFERENZIALE FRA RIATTIVAZIONE VIRALE E RIGETTO ACUTO IN PAZIENTI TRAPIANTATI DI FEGATO

L.Ceccherini-Nelli, A. Giannotti, T. Malizia, P. Ciccorossi*, F. Olivieri*, M. Vanni, S. Lico, D. Campani[§], M. Brunetto*, F. Filippini[°], F. Mosca[°] and M. Campa.

Dip. di Patologia Sperimentale BMIE, Sezione di Microbiologia e Virologia, Università di Pisa; *Servizio di Gastroenterologia ed Epatologia, di [§]Anatomia Patologica e [°]Servizio di Chirurgia Generale e dei Trapianti., Azienda Ospedaliera Pisana.

È stato valutato il significato diagnostico delle IgM anti-HCV nella diagnosi differenziale fra ricorrenza dell'epatite C e rigetto acuto in 129 pazienti trapiantati di fegato. La carica virale di HCV, il valore delle IgM anti-HCV e delle transaminasi seriche (ALT) sono state valutate al momento del trapianto e, successivamente, mensilmente. La biopsia epatica è stata effettuata quando si è rilevato un incremento significativo delle ALT (almeno due volte il valore normale). È stata quindi analizzata la variazione di valore delle IgM anti-HCV al momento della biopsia e quello ottenuto un mese prima, al fine di identificare i valori di variazione associati alla riattivazione virale.

In un *follow-up* di 18 mesi (6-36 mesi) sono state effettuate, da 85 pazienti che hanno mostrato un incremento significativo di ALT, 103 biopsie epatiche, di cui 51 con diagnosi di riattivazione di infezione virale, 33 di rigetto acuto e 19 con caratteri sia di riattivazione che di rigetto acuto.

Mentre non è la viremia di HCV non è la distribuzione dei genotipi di HCV sono risultate correlabili con l'andamento clinico dei pazienti, le IgM anti-HCV sono, invece, significativamente aumentate in 39 casi di riattivazione di epatite, ma non nei casi di rigetto acuto; infatti, sono rimaste stabili o sono diminuite in tutti i casi di rigetto acuto ed in 12 casi di riattivazione dell'infezione epatica. Pertanto, dal presente studio si evince che i livelli serici di IgM anti-HCV correlano significativamente ($p < 0,01$, specificità del 100%, sensibilità del 76.4%) alla recidiva di epatite C. Quindi, il loro aumento, contestualmente ad un incremento significativo delle ALT, contribuisce in modo sostanziale alla diagnosi differenziale clinica fra recidiva virale e rigetto acuto.

Poiché la reinfezione o la riattivazione endogena di CMV sono riportati quali cofattori sia di recidiva virale HCV, che di rigetto acuto, si è valutato, nell'ambito dello stesso studio, se fosse presente infezione attiva da CMV, al momento della biopsia epatica, tramite l'analisi della viremia, delle IgM, e dell'espressione di p65 Ag in leucociti periferici senza, tuttavia, rilevare correlazioni significative.

CINETICA DEL VIRUS DELL'EPATITE B SOTTO TRATTAMENTO CON LAMIVUDINA E MUTAZIONI PRECOCI NEL LOCUS YMDD DEL GENE DELLA DNA POLIMERASI

Ferraro D*, Bonura C*, Di Marco V#, Giglio M*, Craxì A#, Di Stefano R*.

*Dipartimento Igiene e Microbiologia #Cattedra di Gastroenterologia Istituto Clinica Medica, Università di Palermo

Scopi: La lamivudina determina rapida soppressione della replicazione di HBV, ma la comparsa di mutazioni nel locus YMDD ne riduce l'efficacia nei trattamenti di durata oltre 6 mesi. Per valutare se l'analisi della cinetica virale e il rilevamento precoce di mutazioni nel locus YMDD possano predire riattivazioni virologiche e citolitiche, abbiamo studiato una coorte di pazienti con cirrosi da HBV in terapia con lamivudina.

Pazienti e metodi: In 50 pazienti con cirrosi da HBV (età media 51.6; 42/8 M/F; 9 HBeAg +; 48 genotipo D 2 genotipo A) trattati a lungo termine (media 30 mesi) con lamivudina (100 mg/die) si è determinata ogni 3 mesi la presenza di HBV-DNA mediante PCR qualitativa/quantitativa (Amplicor Monitor HBV[®], Roche). La presenza di mutazioni nel gene pol è stata ricercata mediante sequenziamento diretto dopo estrazione e amplificazione del DNA virale.

Risultati: Prima della terapia la mediana dell'HBV-DNA era 14.551.400 copie/ml (range 6.120-40x10⁷). Nessun soggetto presentava mutazioni nel locus YMDD. Dopo 12 mesi di terapia 45 pazienti (90%) erano HBV-DNA negativi (tempo medio di negativizzazione 3.1 mesi) e 5 presentavano una riduzione della viremia di almeno 3 log₁₀ (media 11.879 copie/ml). Durante la terapia (media 20,3 mesi) 20 pazienti (40%) sviluppavano una mutazione nel locus YMDD: 15 YMDD→YIDD, 5 YMD-D→YVDD. Quattro avevano inoltre una mutazione addizionale L→M in posizione 528. In 16 pazienti, al momento del rilievo della mutazione, i valori dell'HBV-DNA erano inferiori di 5 log₁₀ rispetto al basale (media 22.580 copie/ml, range 410-98.789). In 15 soggetti la comparsa di mutazione YMDD è stata seguita da una elevazione di HBV-DNA superiore a 6 log₁₀ (range 1.560.890 – 175x10⁶ copie/ml), con aumento delle transaminasi (in 7 casi oltre 10 volte la norma) entro 1-18 mesi dalla comparsa della mutazione. In 5 pazienti alla comparsa della mutazione YMDD non è seguita una riattivazione virologica o biochimica. Non vi era correlazione tra tipo di mutazione e successiva cinetica dell'HBV-DNA.

Conclusioni: La quantificazione di HBV-DNA durante la terapia con lamivudina individua precocemente i pazienti con mutazioni YMDD, cui segue nel 75% dei casi entro alcuni mesi una riattivazione virologica e biochimica di malattia. Il monitoraggio è particolarmente utile per i pazienti cirrotici a rischio di insufficienza epatica in caso di riattivazione, e per modificare l'approccio terapeutico.

PREVALENZA DI INFEZIONE DA VIRUS DELL'EPATITE C IN UN GRUPPO DI SOGGETTI NON SELEZIONATI PER FATTORI DI RISCHIO IN UN'AREA GEOGRAFICA DEL NORD ITALIA.

Martinelli Monica, Medici Maria Cristina, Valcavi Pierpaolo, Arcangeletti Maria Cristina, Calderaro Adriana, De Conto Flora, Motta Federica, Pinardi Federica, Aloisi Annalisa, Ferraglia Francesca, Casula Francesca, Chezzi Carlo e Dettori Giuseppe.

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

In questo studio è stata valutata la prevalenza degli anticorpi anti-HCV e dell'HCV-RNA in soggetti ricoverati presso reparti chirurgici, quali rappresentativi della popolazione generale (il gruppo era costituito da soggetti adulti asintomatici i cui sieri sono stati sottoposti alla ricerca degli anticorpi anti-HCV in quanto prevista dal protocollo delle indagini preoperatorie) e in soggetti ricoverati presso reparti di medicina od osservati ambulatorialmente. La prevalenza complessiva degli anticorpi anti-HCV, rivelati mediante saggio immunoenzimatico di terza generazione su 54580 sieri e confermati mediante immunoblot con antigeni ricombinanti (RIBA), è stata dell'8,3% (6,8% nei soggetti ricoverati presso i reparti chirurgici e 9,8% nei soggetti ricoverati presso i reparti di medicina o ambulatoriali). La prevalenza dell'HCV-RNA nel siero, rivelato mediante reazione polimerasica a catena previa retrotrascrizione (RT-PCR) complessivamente su 553 soggetti, è stata del 61,1% con una differenza statisticamente non significativa tra i soggetti ricoverati presso i reparti chirurgici (60,8%) e quelli ricoverati presso i reparti di medicina o ambulatoriali (61,3%). I sieri sottoposti a RT-PCR sono stati quindi analizzati per la positività anticorpale ai differenti antigeni (simultanea presenza degli anticorpi diretti nei confronti degli antigeni C22p, C33c, C100p e nei confronti degli antigeni C22p, C33c, C100p, NS5) quale possibile indicatore di maggior rischio per l'evoluzione dell'infezione verso la cronicizzazione. Tale positività è stata osservata in correlazione con la presenza di HCV-RNA nel 96,4% e 94,9% dei casi rispettivamente nei soggetti ricoverati presso reparti chirurgici, pari al 22,3% (nei confronti di C22p, C33c, C100p) e al 46,3% (nei confronti di C22p, C33c, C100p, NS5) dei 121 soggetti ricoverati presso reparti chirurgici con HCV-RNA nel sangue.

I risultati ottenuti evidenziano che un tasso significativo di infezioni da HCV decorre in forma subclinica e inducono a ipotizzare l'esistenza nella popolazione generale di un numero relativamente alto di soggetti asintomatici candidati ad un possibile decorso cronico dell'infezione.

IL GENE ORF50 DELL'HERPESVIRUS UMANO 8 AUMENTA LA SUSCETTIBILITÀ CELLULARE ALL'INFEZIONE DA HIV

Di Luca, D., Caselli E., Galvan M., Mazzali A., Rotola A., Caruso A.*, e Cassai E.
Sez. Microbiologia, Università Ferrara; Ist. Microbiologia Università Brescia

ORF50 dell'herpesvirus umano 8 (HHV-8) codifica una proteina con attività transattivante, la cui espressione è necessaria per la riattivazione dell'infezione latente e per la replicazione litica. Recentemente, abbiamo descritto che ORF50 sinergizza con il gene *tat* di HIV-1, interagendo a livello posttrascrizionale. Per studiare gli effetti di queste interazioni molecolari sulla biologia e sulla replicazione di HIV, abbiamo transfettato ORF50 in diverse linee cellulari, che poi sono state infettate con HIV. I risultati hanno dimostrato che ORF50 incrementa la replicazione di HIV in cellule linfoidi T e B (Jurkat, BC-3), che sono di per sé naturalmente permissive ad HIV. Inoltre, ORF50 induce uno stato transiente di suscettibilità e permissività in cellule B e della glia (BCBL-1, A172), che naturalmente non sono suscettibili ad HIV. Questo meccanismo sembra essere mediato almeno in parte da un incremento dell'espressione dei recettori e dei corecettori per HIV. Tuttavia, il comportamento diverso osservato nelle linee cellulari B suggerisce che l'azione di ORF50 sia modulata dall'ambiente intracellulare. Inoltre, le cellule non suscettibili trasformate con ORF50 mostravano una produzione transiente di HIV, in grado di diffondere per contatto diretto alle cellule vicine. Questi risultati mostrano che ORF50 di HHV-8 incrementa la replicazione di HIV in tutte le linee cellulari analizzate e suggerisce che anche piccoli foci di infezione litica di HHV-8 possono indurre la replicazione e l'amplificazione di HIV sia in cellule B che nel sistema nervoso centrale.

DETERMINAZIONE DI MUTAZIONI CORRELATE A FARMACORESISTENZA IN SOGGETTI HIV-1 INFETTI, MAI SOTTOPOSTI A TERAPIA ANTIRETROVIRALE.

Monari P., Bon I., Vitone F., Gorini R., Gori E., Schiavone P., Gibellini D., Raffaelli S., Re M.C.

Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Medicina Clinica Specialistica e Sperimentale, Università degli Studi di Bologna, Via Massarenti, 9 -40138 Bologna

Lo studio della farmaco-resistenza sta rapidamente passando dalla fase puramente sperimentale alla applicazione nella pratica clinica, assumendo un'importanza fondamentale per una guida corretta al trattamento farmacologico, e fornendo al tempo stesso utili informazioni sulla circolazione dei ceppi virali resistenti.

In seguito alla introduzione della HAART (highly active antiviral therapy), in grado di ridurre, in modo efficace, la replicazione del virus in molti soggetti infetti, si sono verificati alcuni cambiamenti radicali a livello epidemiologico, accompagnati da un calo significativo della mortalità e della morbilità.

Esistono numerosi studi che testimoniano che una parte di "nuove" infezioni sono causate da ceppi virali "modificati" in cui sono già presenti mutazioni, in grado di conferire resistenza a uno o più farmaci anti-retrovirali anche se pochi dati sono disponibili relativamente all'andamento di questo fenomeno durante l'infezione cronica, caratterizzata da un livello relativamente contenuto (< del 5%), di resistenze, rispetto all'infezione acuta, contraddistinta da una prevalenza di resistenze nettamente più elevata (fino al 26%).

Scopo di questo lavoro è stato quello di verificare la presenza di mutazioni correlate a farmaco resistenza in un gruppo di soggetti (*naive* per la terapia) con infezione cronica (sierconversione accertata da oltre 28 mesi) sia mediante analisi genotipica, sia mediante lo studio del fenotipo virtuale. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza un'ottima concordanza tra i due test utilizzati ad eccezione di due casi.

In base a ciò, sarà indispensabile che i test in grado di mettere in evidenza le mutazioni correlate a farmaco-resistenza divengano uno strumento per l'ottimizzazione e l'individualizzazione della terapia, riducendo il rischio di decisioni che potrebbero avere esito negativo sia per il trattamento del paziente che per la preservazione del serbatoio di farmaci disponibili.

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEL DNA PROVIRALE IN SOGGETTI HIV-1 SIEROPOSITIVI SOTTOPOSTI A TERAPIA ANTIRETROVIRALE

Vitone F., Gibellini D., Schiavone P., Gorini R., Carli S., Bon I., Monari P., Re M.C.

Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Medicina Clinica Specialistica e Sperimentale, Università degli Studi di Bologna, Via Massarenti, 9 - 40138 Bologna

Pur essendosi verificati, in seguito alla introduzione della HAART (highly active antiviral therapy), alcuni cambiamenti radicali a livello epidemiologico, accompagnati da un calo significativo della mortalità e della morbilità, la persistenza del virus in numerose cellule e tessuti, veri e propri serbatoi difficilmente penetrabili dai farmaci, pone dei limiti insormontabili all'eradicazione dell'infezione stessa.

La determinazione del numero di copie di DNA provirale rappresenta, a tale proposito, un riferimento fondamentale per quantificare la consistenza del *reservoir* dell'infezione nelle cellule mononucleari (PBMC) del sangue periferico. La possibilità di quantificare la presenza di HIV-1 RNA nel plasma e di DNA provirale (in forma integrata e non) nei linfomonociti rappresentano due parametri fondamentali per la prognosi dell'infezione.

A tale scopo abbiamo messo a punto un metodo di PCR quantitativa *real time* in grado di quantificare il numero di copie di DNA provirale di HIV-1. Tale metodo utilizza il fluorocromo, SYBR green, in grado di legarsi alla doppia catena di DNA del prodotto PCR e di emettere ad una specifica lunghezza d'onda. Tale legame, analizzato mediante LightCycler permette di quantificare il numero di copie presenti attraverso una specifica curva di riferimento.

Sono stati analizzati 52 soggetti HIV sieropositivi, sottoposti a terapia antiretrovirale e 20 donatori di sangue. I risultati ottenuti hanno mostrato una estrema sensibilità ed affidabilità della metodica utilizzata, in grado di mettere in evidenza un numero significativo di copie di DNA provirale, anche pazienti in cui la presenza di HIV-1 RNA risultava nettamente inferiore ai limiti di sensibilità del test (<50 copie di RNA/ml), suggerendo, ancora una volta, che solamente la valutazione globale di tutti i parametri a disposizione rappresenterà uno strumento fondamentale per verificare la necessità o meno di ulteriori trattamenti farmacologici.

FATTORI CELLULARI COINVOLTI NELLA RESISTENZA AD ALCUNI INIBITORI NUCLEOSIDICI DELLA TRASCRIPTASI INVERSA DI HIV.

O. Turriziani¹, J. Schuetz², C. Scagnolari¹, I. Solimeo¹, F. Bellomi¹, F. Bambacioni³, O. Butera¹, F. Focher⁴, G. Antonelli¹.
1. Dip.to Med. Sper. e Patologia-Sez. Virologia, Università "La Sapienza", Roma. 2 St. Jude Children Hospital, Memphis;. 3. Università Campus Bio-medico, Roma; 4. IGBE, CNR Pavia.

L'ipotesi di lavoro consiste nel verificare la possibilità che il trattamento prolungato con inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRTI) possa indurre modificazioni metaboliche cellulari che contribuiscano alla resistenza ai farmaci antiretrovirali. I dati finora ottenuti indicano che diversi analoghi nucleosidici, quali AZT, d4T e 3TC sono in grado di selezionare cellule resistenti; al contrario altri composti come ddI e abacavir (ABV) non sembrano possedere una elevata capacità di "induzione" di farmacoresistenza. In particolare due tipi di meccanismi sono stati osservati come responsabili della scarsa sensibilità delle cellule agli NRTI: l'alterazione di alcuni enzimi coinvolti nella attivazione dei composti in questione, e l'aumentata espressione di proteine di membrana deputate all'espulsione di sostanze tossiche. La resistenza cellulare all'AZT e al d4T è legata alla ridotta attività della timidina chinasi (TK), l'enzima responsabile della prima fase di fosforilazione di questi composti. E' stato inoltre osservato che questi due analoghi della timidina hanno una diversa capacità di selezionare cellule con un fenotipo resistente. La resistenza cellulare al 3TC, invece, e' dovuta ad un trasportatore di membrana. Infatti le cellule trattate con il 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) e non ad una ridotta attività dell'enzima timidina chinasi. 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, suggerendo che altri trasportatori possano essere coinvolti in questo fenomeno. Ulteriori studi hanno dimostrato che le CEM3TC presentano un modesto aumento dell'espressione di un gene codificante per l'ABCC11, un omologo della MRP5, che potrebbe, quindi, essere responsabile della ridotta capacità di queste cellule di accumulare il 3TC.

RILEVAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI IMMUNOCOMPLESSI VIRUS-SPECIFICI NELL'INFEZIONE CRONICA DA HIV.

E. Riva¹, G. Antonelli², O. Turriziani¹, L. Antonelli³, F. Bambacioni¹, S. Tyring⁴, DA. Carrasco⁴, S. Baron⁴ and F. Diazani¹.
1. *Sezione di Virologia, Università Campus "Bio-Medico", Roma;*
2. *Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia, Sezione di Virologia, Università "La Sapienza", Roma;*
3. *Dipartimento di Malattie Infettive, Policlinico "Umberto I", Roma;*
4. *Dipartimento di Microbiologia ed Immunologia, Medicina Interna e Dermatologia, Università del Texas Medical Branch, Galveston.*

E' ormai stato ampiamente dimostrato che durante l'infezione acuta di HIV persistono condizioni di elevata carica virale (misurata come copie di HIV-RNA) ed elevata infettività fino al momento in cui non viene prodotta dall'organismo una risposta immune efficace (soprattutto legata alla produzione di anticorpi) in grado di ridurre o neutralizzare l'infettività virale. Al contrario, durante l'infezione cronica, la presenza di una carica virale elevata non corrisponde ad altrettanta infettività che risulta notevolmente ridotta rispetto ai livelli osservati durante la fase acuta. La bassa infettività virale osservata in questa fase dell'infezione potrebbe essere dovuta alla presenza di anticorpi neutralizzanti nel siero con conseguente formazione di immunocomplessi (ICs) circolanti. Lo scopo di questo studio è stato quello di dimostrare la presenza di ICs HIV-specifici durante le diverse fasi dell'infezione da HIV. I risultati ottenuti hanno dimostrato che gli immunocomplessi presenti nel plasma dei soggetti con infezione cronica da HIV, catturati tramite l'utilizzo di biglie magnetiche rivestite di proteina A, contengono HIV-RNA (80%-100%) associato ad immunoglobuline della classe di IgG. Al contrario, i sieri derivati da soggetti con infezione acuta, non contengono (o ne contengono in maniera non rilevabile) virus legato ad immunocomplessi. Inoltre è stato possibile dimostrare attraverso un saggio di neutralizzazione contro un ceppo standard di HIV che gli immunocomplessi, ottenuti tramite ultrafiltrazione, contengono IgG in grado di neutralizzare in maniera specifica ed irreversibile l'infettività di HIV. I dati ottenuti dimostrano pertanto che l'HIV RNA presente nei pazienti con infezione cronica da HIV è per la maggior parte presente in forma di immunocomplessi e che gli anticorpi presenti negli ICs sono di tipo neutralizzante. Questi risultati sembrano inoltre confermare che la bassa infettività virale, riscontrata durante la fase cronica dell'infezione, possa essere dovuta alla neutralizzazione del virus da parte di anticorpi specifici con conseguente formazione di ICs circolanti ed importanti implicazioni patogenetiche.

ELEVATA CIRCOLAZIONE DI GENOTIPI DI HPV AD ALTO RISCHIO IN PAZIENTI AMBULATORIALI.

Anna Marta Degener*, Alessandra Pierangeli* e Ferdinando Dianzani

**Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia, Sezione di Virologia, Università "La Sapienza" e Campus Biomedico, Roma*

I papillomavirus umani (HPV) identificati e classificati in base alla sequenza genomica completa sono ormai più di 90: fra questi i tipi 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58 e 59 sono ufficialmente considerati come carcinogeni di gruppo I per l'uomo dall'International Agency for Research on Cancer (IARC, 2000). Tuttavia l'elenco degli HPV ad alto rischio di trasformazione oncogena è destinato ad accrescersi data la continua identificazione di nuovi genotipi e la scarsità di casistica disponibile sui ceppi rari. La caratterizzazione completa del potenziale oncogeno di tutti i tipi di HPV sarebbe importante nella pratica clinica per stabilire il trattamento ed il *follow up* del paziente e nel concentrare le indagini di laboratorio ai tipi ad alto rischio.

L'utilizzo della PCR per amplificare diverse regioni genomiche di HPV risulta perciò utile per la pratica diagnostica, per l'esatta tipizzazione e per la caratterizzazione del potere oncogeno dei ceppi rari o di nuovo isolamento.

A questo scopo negli ultimi due anni, abbiamo studiato una popolazione selezionata di donne che si rivolgevano all'ambulatorio ginecologico per controlli periodici preventivi o per lievi disturbi. Tutti i campioni, costituiti da cellule esfoliative vaginali, sono stati sottoposti ad amplificazione delle regioni L1 ed E6/7, utilizzando primer 'consensus' degenerati che ibridizzano con i genotipi di HPV che infettano le mucose genitali.

Su un totale di 847 donne, 73 campioni sono risultati positivi per HPV (8.6%), dato compatibile con le statistiche pubblicate relative all'incidenza di HPV in popolazioni normali. La genotipizzazione degli HPV presenti, eseguita mediante analisi di sequenza dei prodotti di PCR ottenuti, ha evidenziato la circolazione di 26 tipi diversi con una netta e sorprendente prevalenza di genotipi ad alto rischio o considerati rari (68.49%). Inoltre in circa il 20% dei campioni è stato possibile evidenziare e tipizzare il virus solo in base alla sequenza delle proteine oncogene; questi casi suscitano particolare interesse dal punto di vista clinico in quanto non è possibile prevederne la prognosi e solamente mediante un accurato *follow up* si potrà definire il significato patologico di questo ritrovamento.

VALUTAZIONE DI DIVERSI SISTEMI DI RILEVAMENTO E DI IDENTIFICAZIONE DELL'HPV-DNA IN SCRAPING CERVICALI.

*Lama A., Giovannelli L., Capra G., Ammatuna P.

Dipartimento di Igiene e Microbiologia, Università di Palermo.

La diagnosi di laboratorio di infezione cervicale da HPV, sia nei casi di lesioni conclamate che sospette, richiede metodi sensibili di biologia molecolare. Quelli più largamente utilizzati comprendono il test di ibridazione in fase liquida Hybrid Capture II (HC II) e il sistema di amplificazione "one step" con primers generici degenerati diretti verso la regione consensus L1, [PCR con primers MY09/MY11 (MY-PCR)]. Amplificazioni "two step" [nested PCR con primers MY09/MY11 e GP5+/GP6+ (nPCR)], pur essendo più sensibili, sono più laboriose e suscettibili di contaminazioni e quindi meno utilizzate nella pratica clinica. Recentemente è stata introdotta una nuova PCR "one step" che utilizza i primers generici non degenerati PGMY09/PGMY11 (PG-PCR), risultata più sensibile della MY-PCR standard e meno complessa di una PCR "two-step". Noi abbiamo applicato la PG-PCR a una serie di scraping cervicali precedentemente saggiati in MY-PCR e HC II, per testare i risultati di tale PCR rispetto a questi metodi diagnostici clinicamente validati, anche in paragone con la nPCR. Tutti i prodotti di amplificazione sono stati sequenziati per la tipizzazione dell'HPV-DNA. La sensibilità delle PCR, testata per mezzo delle diluizioni di linee cellulari HPV-positive (HeLa, SiHa), è stata di 150, 50 e 1 copie di HPV-DNA per MY-, PG- e nPCR rispettivamente. Sono stati analizzati 451 tamponi cervicali selezionati, comprendenti campioni positivi per HPV-DNA sia in MY-PCR che in HC II (n=116, gruppo 1), solo in MY-PCR (n=40, gruppo 2), solamente in HC II (n=112, gruppo 3) o HPV-DNA negativi in entrambi i saggi (n=183, gruppo 4). La presenza di HPV-DNA è stata confermata tramite PG-PCR nel 100% dei campioni nei gruppi 1 e 2, riscontrata mediante amplificazione con PG-PCR e nPCR nel 48.2% e 60.7% nel gruppo 3 e trovata *ex novo* nel 2.2% e 8.2% nel gruppo 4, rispettivamente. Sono stati osservati risultati compatibili per 23 genotipi HPV, mentre solo la PG-PCR ha identificato i genotipi 87, 44, 51 e 32 (gruppo 3). Noi proponiamo un protocollo per la ricerca di HPV-DNA basato sull'analisi preliminare per mezzo dei saggi ad ampio spettro PG-PCR e HC II seguita dall'analisi dei campioni negativi per mezzo della più sensibile nPCR.

RILEVAMENTO DI HPV-DNA IN SCRAPING ORALI DI SOGGETTI CON DIFFERENTI FORME CLINICHE DI LEUCOPLACHIA E LICHEN PLANUS.

*Giordano V¹, Giovannelli L.¹, Lama A.¹, Capra G.¹, Di Liberto C.², Campisi G.², Ammatuna P.¹.

¹ Dip. di Microbiologia, ² Dip. di Scienze Stomatologiche, Università di Palermo.

Lo scopo di questo studio è stato quello di ricercare la presenza di infezione orale da HPV in pazienti con differenti forme cliniche di due tipi di lesioni orali potenzialmente maligne, quali la leucoplachia (OL, n=68) e il lichen planus (OLP; n=71). La ricerca di HPV-DNA nelle cellule della mucosa orale è stata eseguita mediante nested PCR (primers MY/GP) e il genotipo di HPV è stato determinato tramite sequenziamento diretto degli amplificati virali. Sono state analizzate in un modello statistico (logit) le variabili aspetto verrucoso o non verrucoso e forma omogenea (stadio 1) o non omogenea (stadio 2) per la OL, forma AE (atrofica-erosiva) o non-AE (non atrofica-erosiva) per l'OLP e le variabili età, sesso, fumo e alcool dei pazienti in studio. La presenza di HPV è stata dimostrata nel 18% delle OL e nel 19.7% degli OLP. La differente prevalenza di HPV-DNA nelle OL non ha raggiunto significatività statistica sia nel caso degli stadi 1 e 2 (34% vs 66%; OR=0.20; 95% IC: 0.02-2.02) che nel caso delle forme verrucose confrontate con quelle non verrucose (20% vs 17.2%; OR=2.85; 95% IC:0.12-65.44); allo stesso modo, la differente prevalenza di HPV-DNA nelle forme AE e non-AE di OLP (22.7% e 25.7%) sembra essere casuale (OR=0.85; 95% IC:0.235-3.09). Nessuna associazione statistica è stata trovata tra la presenza di HPV-DNA e le varianti demografiche considerate. Il genotipo 18 di HPV è stato trovato rispettivamente nell'85.7% e nell'89% dei campioni di OL e OLP HPV positivi.

Questo studio non ha dimostrato alcuna relazione tra infezione da HPV e specifiche forme cliniche di OL e OLP. La presenza di HPV potrebbe essere una conseguenza della distruzione delle cellule dell'epitelio basale a livello delle lesioni, le quali favorirebbero l'esposizione all'HPV e la conseguente infezione produttiva.

UTILITA' DEL TEST HYBRID CAPTURE II PER LA RICERCA HPV DNA A LIVELLO CERVICALE IN DONNE CON DIAGNOSI CITOLOGICA DI ASCUS

*Capra G.1, Giovannelli L.1., Lama A.1, Genco A.2, Bustinto T.2, Ammatuna P.1

¹ Dipartimento di Igiene e Microbiologia- Università di Palermo,

² ASL 6 – Palermo.

La classificazione citologica delle ASCUS (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance) riguarda anomalie cellulari non abbastanza severe per essere incluse nella diagnosi di lesioni intraepiteliali squamose di basso (L-SIL) o alto grado (H-SIL). Attualmente la diagnosi citologica di ASCUS comprende sia casi di probabili alterazioni cellulari indicativi di reattivi/riparativi (ASCUS reattivi), sia casi che potrebbero indicare presenza di L-SIL o H-SIL, da inviare a colposcopia (ASCUS colposcopia).

Nel nostro studio abbiamo ricercato la presenza di DNA di HPV ad alto rischio (HR-HPV), il cui ruolo nella carcinogenesi cervicale è ampiamente dimostrato, mediante l'impiego del test di ibridazione in fase liquida Hybrid Capture II (HC II; Digene, Gaithersburg, MD). I tamponi cervicali analizzati sono stati ottenuti da 104 donne con ASCUS reattivi e da 96 donne con ASCUS colposcopia.

In totale, la presenza di DNA di HR-HPV è stata evidenziata nel 26,5% di ASCUS e le SIL istologicamente confermate sono state il 21,5%. La frequenza di DNA di HR-HPV in ASCUS colposcopia è stata significativamente più alta che nelle ASCUS reattive (47,9% vs 6,7%, $p < 0,001$). H-SIL sono state associate con il 36,4% di ASCUS colposcopia, mentre un solo caso di L-SIL (con presenza di DNA di HR-HPV) è stato riscontrato tra gli ASCUS reattivi.

I nostri risultati preliminari confermano la relativa mancanza di infezione da HR-HPV in pazienti con diagnosi citologica di ASCUS reattiva. Il test HC II potrebbe essere utilizzato quindi nel *triaging* di donne con ASCUS colposcopia da mantenere sotto sorveglianza citologica (HR-HPV negative) e di quelle che invece necessitano di colposcopia immediata (HR-HPV positive).

INDAGINI SUI VIRUS DEL GRUPPO TT COME AGENTI DI INFEZIONI RESPIRATORIE NELL'INFANZIA

Maggi F¹, Pifferi M², Fornai C¹, Andreoli E¹, Tempestini E¹, Vatteroni ML¹, Lanini L¹, Presciuttini S¹, Pietrobelli A³, Boner A³, Pistello M¹, Bendinelli M¹.

Sez. Virologia e Centro Retrovirus, Dipartimento di Patologia Sperimentale¹; Dipartimento di Pediatria², Università di Pisa; Dipartimento di Pediatria³, Università di Verona.

Il virus TT (TTV) è il prototipo di un vasto gruppo di piccoli virus ancora di incerta classificazione, sebbene presentino significative somiglianze con i circovirus di varie specie animali. Ad oggi, ne sono stati individuati oltre 30 genotipi, provvisoriamente suddivisi in cinque sottogruppi principali, tra loro filogeneticamente molto distanti. Come i circovirus, questi virus hanno un piccolo genoma circolare di DNA monocatenario a polarità negativa che comprende una porzione codificante ed una più piccola non tradotta e altamente conservata. La storia naturale di questi virus è ancora poco conosciuta ma l'elevata frequenza con cui essi si riscontrano nel plasma indica che la cronicizzazione è un esito molto comune dell'infezione. Poiché il virus è acquisito già nei primi anni di vita, la popolazione infantile rappresenta il campione più indicato per investigare i possibili effetti patogeni associati con l'infezione primaria da TTV. In questo studio, un gruppo di 157 neonati, di età compresa fra 1 e 24 mesi e ricoverati per malattie respiratorie acute, sono stati esaminati per la presenza, i titoli e i genogruppi di TTV presenti nelle secrezioni nasali e nel sangue periferico mediante metodi di PCR real-time e genogruppo-specifica nonché per la presenza di virus respiratori convenzionali con i metodi standard. La maggior parte dei soggetti esaminati (75%) ha mostrato DNA virale nelle secrezioni nasali con titoli che costantemente superavano quelli nel corrispondente campione di sangue, ove, in alcuni casi TTV non risultava dimostrabile. La caratterizzazione genetica del virus presente nel tratto respiratorio ha spesso evidenziato la contemporanea presenza di più di un sottogruppo di TTV e differenti forme di discordanza rispetto alle sequenze del virus in circolo. Significative correlazioni sono state trovate fra la severità della patologia respiratoria, i titoli del virus e la presenza del sottogruppo 4 di TTV nelle narici. I risultati dimostrano che le secrezioni nasali rappresentano un mezzo importante di escrezione di TTV e che il tratto respiratorio superiore è una porta di entrata ed un sito di replicazione primaria del virus. Ulteriori indagini sono comunque necessarie per valutare la possibilità che TTV possa giocare un ruolo eziopatogenetico nelle malattie acute dell'infanzia.

CAPACITA' DI PLECONARIL DI ERADICARE IN VITRO L'INFEZIONE PERSISTENTE DA VIRUS COXSACKIE B4

Andreina BAJI, Gian Mario FRIGO2, A. TONIOLO1.

1Laboratorio di Microbiologia, Università dell'Insubria, Varese; 2Laboratorio di Farmacologia, Università di Pavia.

Pleconaril (Viropharma) è un farmaco antivirale attivo sia contro gli enterovirus che i rhinovirus. Il farmaco agisce inibendo il legame del virus ai recettori e il processo di scapsidamento. Sebbene sia risultato attivo nel trattamento di infezioni acute, non è mai stata valutata la sua capacità di eradicare infezioni croniche. Ci siamo proposti di valutare l'efficacia del farmaco nell'infezione persistente di linee cellulari da parte di un virus cardiotropo (coxsackie B4, ceppo JVB; CBV4). Si sono utilizzate cellule epiteliali infettate con CBV4 in maniera acuta o persistente (CaCo-2, intestinali e AV3, amniotiche). Nelle due linee cellulari si è ottenuto uno stato di infezione persistente mantenendo le cellule in coltura dopo infezione a bassa m.o.i. ed effettuando passaggi seriati. L'effetto del farmaco è stato valutato come a) inibizione dell'effetto citopatico, b) diminuzione del rilascio di progenie virale, c) riduzione del numero di cellule producenti virus (test di immunofluorescenze con anticorpi anti-CBV4). In ambedue le linee cellulari la concentrazione citotossica 50% (CC50) di Pleconaril è risultata di 12,5 µg/ml (test di proliferazione cellulare XTT). Nell'infezione acuta, la concentrazione inibitoria 50% (IC50) è risultata di 0,06 µg/ml e l'indice terapeutico (TI = CC50/IC50) di 208. Nell'infezione persistente di colture infettate da oltre 70 giorni, Pleconaril ha dimostrato solo un effetto parziale. A concentrazioni $\geq 0,01$ µg/ml, il titolo virale si è ridotto solo di 5 volte nelle cellule AV3 e di 125 volte nelle cellule CaCo-2. Il trattamento con Pleconaril ha tuttavia ridotto di circa un terzo la percentuale di cellule infettate (AV3: da 11% a 7%; CaCo-2: da 15% a 10%). Poiché Pleconaril non è risultato capace di eradicare l'infezione persistente con un singolo ciclo di trattamento, si è valutata la capacità del farmaco di cooperare con un anticorpo monoclonale che neutralizza CBV4 (mAb 356.1; IgG2). Il trattamento con mAb 356.1 da solo ha abolito il virus extracellulare, ma non ha ridotto la percentuale di cellule infettate e non ha eradicato l'infezione. Il trattamento delle colture con anticorpo monoclonale (1 µg/ml) più pleconaril (0,1 µg/ml) ripetuto per 3 passaggi successivi è invece riuscito ad eradicare l'infezione persistente sia nelle cellule AV3 che nelle CaCo-2. Questi risultati suggeriscono che Pleconaril possa cooperare con la risposta anticorpale dell'ospite per eradicare un'infezione cronica da enterovirus.

SVILUPPO DI UNA PCR NESTED-SEMIQUANTITATIVA PER LA DETERMINAZIONE CONTEMPORANEA DELLA CARICA VIRALE DEL JCV E BKV

Bergallo M., Merlino C., Giacchino F.*, Negro Ponzi A., Cavallo G., Cavallo R.

Dip. Sanità Pubblica e Microbiologia, U.O.A.D.U. Virologia, Università degli Studi di Torino

**Dip. di Nefro-Urologia, U.O.A. Nefrologia e Dialisi, Ospedale Civile, Ivrea (Torino)*

I poliomavirus umani BK e JC (BKV e JCV) infettano oltre il 60% della popolazione umana. Dopo il superamento dell'infezione primaria, entrambi i virus rimangono latenti nel rene e nei linfociti B. Quasi tutte le patologie attribuibili al BKV ed al JCV si verificano in condizione di immunodepressione, per la maggior parte dei casi come risultato della riattivazione del virus latente. A differenza del JCV che possiede neurotropismo, le patologie BKV-correlate sono fondamentalmente confinate al tratto urinario. I trapiantati renali sono suscettibili all'azione di questi due virus non solo come risultato della loro riattivazione, ma anche perché possono essere veicolati nell'organismo attraverso l'organo trapiantato. Le infezioni da BKV e da JCV si verificano indipendentemente, ma in questi pazienti possono anche verificarsi infezioni concomitanti e persistenza contemporanea di entrambi i virus. In numerosi studi il BKV è stato correlato con la nefrite interstiziale nei portatori di trapianto renale, in cui il trattamento immunodepressivo sembra indurre o almeno permettere la riattivazione del virus. In questi pazienti l'escrezione del virus nelle urine ha un'incidenza del 5-45% e la replicazione massiva del BKV nell'epitelio tubulare risulta nella perdita dell'organo in circa il 3-5% di essi. Recentemente è stato ipotizzato che nei trapiantati renali alcuni casi di nefropatia possano essere associati al JCV. L'utilità clinica della PCR qualitativa è limitata data la natura ubiquitaria di questi virus e la sola presenza del DNA virale non può essere considerata indice diagnostico. Nel nostro laboratorio abbiamo messo a punto una metodica di nested-PCR semi-quantitativa allo scopo di valutare la carica virale sia del JCV che del BKV in questi pazienti per meglio valutare il ruolo patogenetico di questi due virus nell'insorgenza della nefropatia. Tale metodica si basa sulla valutazione comparativa degli amplificati virali con gli amplificati ottenuti da diluizioni scalari della stessa sequenza bersaglio (standard esterno). L'utilizzo della tecnica nested permette uno screening dei campioni negativi perché nella prima quantificazione si utilizzano primers comuni al BKV e JCV mentre con la seconda amplificazione, effettuata solamente sui campioni positivi, vengono quantificati il JCV e/o il BKV separatamente.

RUOLO DELLA CHINASI IKK NELLA REPLICAZIONE DEL VIRUS HERPES SIMPLEX DI TIPO 1.

Carla Amici¹, Giuseppe Belardo¹, Antonio Rossi² e M. Gabriella Santoro^{1,2}

¹ *Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Roma Tor Vergata;*

² *Istituto di Neurobiologia e Medicina Molecolare, CNR, Roma.*

Il complesso chinasi IKK è l'enzima responsabile dell'attivazione del fattore nucleare κB (NF- κB), un fattore trascrizionale eucariotico coinvolto in vari processi patologici, tra cui la progressione dell'AIDS per la sua azione "enhancer" sulla trascrizione del virus HIV-1. NF- κB è normalmente presente nel citoplasma cellulare come un complesso eterodimerico inattivo legato a proteine inibitorie della famiglia I κB . L'attivazione di IKK induce la fosforilazione e successiva degradazione proteasomica della proteina I $\kappa\text{B}\alpha$ con conseguente liberazione e traslocazione nucleare dei dimeri NF- κB che, legandosi a specifiche sequenze κB , attivano la trascrizione di un'ampia varietà di geni cellulari coinvolti nell'infiammazione e nella risposta immunitaria. Abbiamo recentemente dimostrato che l'infezione con il virus Herpes Simplex di tipo 1 (HSV-1) induce NF- κB in cellule umane, attivando una via di trasduzione del segnale che converge sulla chinasi IKK. L'induzione di IKK è dipendente dall'espressione dei geni IE di HSV-1. Il fattore NF- κB indotto dall'infezione erpetica risulta essere attivo trascrizionalmente ed è coinvolto nel controllo dell'espressione del genoma virale e nella progressione del ciclo di replicazione di HSV-1. Il trattamento con prostaglandine ciclopentenoniche, che previene l'attivazione di NF- κB attraverso il blocco dell'attività della subunità β di IKK, causa una riduzione dell'espressione dei geni virali ed inibisce la replicazione di HSV-1. Inoltre, abbiamo dimostrato che l'infezione erpetica è in grado di indurre la riattivazione del virus HIV-1 in cellule linfoblastoidi cronicamente infette, e che l'inibizione di IKK β previene la transattivazione del genoma retrovirale. I risultati identificano la chinasi IKK come potenziale bersaglio per chemioterapici antivirali di nuova concezione.

RICERCA DI HERPESVIRUS UMANO-6 (HHV-6) IN CAMPIONI DI TESSUTI CEREBRALI

Cermelli C.1,2, Donati D.2,3, Beretti F.1, Jacobson S.2, Portolani M.4

1Dipartimento di Sc. Igienistiche, Microbiologiche e Biostatistiche, Università degli Studi di Modena e Reggio E.; 2Viral Immunology Section, NINDS, NIH, Bethesda, MD, USA; 3Dipartimento di Biologia Molecolare, Sez. di Microbiologia, Università di Siena; 4Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Università degli Studi di Modena e Reggio E.

L'herpesvirus umano-6 (HHV-6) è un virus ubiquitario la cui infezione primaria viene acquisita nei primissimi anni di vita. Agente causale dell'exanthema subitum e di patologie febbrili dell'infanzia *sine exanthema*, è un virus dotato di ampio tropismo cellulare e, raramente, può rendersi causa di patologie, anche severe, in molti organi. Inoltre, HHV-6 presenta uno spiccato neurotropismo e molti studi hanno dimostrato la sua associazione con diverse malattie del sistema nervoso centrale (SNC) quali encefalite, convulsioni, malattie demielinizzanti, sclerosi multipla (SM).

Nel presente studio, utilizzando metodiche di PCR quantitativa e immunostochimica, abbiamo ricercato la presenza di HHV-6 in campioni cerebrali ottenuti da interventi chirurgici nel tentativo di definire il livello e la localizzazione della distribuzione di questo virus nel tessuto nervoso. Inoltre, espunti di biopsie cerebrali sono stati messi in coltura e caratterizzati per determinare se HHV-6 poteva essere messo in evidenza in queste cellule.

Vengono presentati risultati preliminari da tessuti freschi e tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina ottenuti da pazienti con una varietà di disturbi neurologici come tumori cerebrali, angioma cavernoso, epilessia. Sono state ottenute linee cellulari fenotipicamente e morfologicamente caratterizzate come astrociti e oligodendrociti nelle quali è stato messo in evidenza HHV-6. Inoltre, mediante PCR e immunostochimica, la presenza del virus è stata documentata in una percentuale significativa di campioni.

Questi risultati preliminari confermano precedenti osservazioni che HHV-6 è presente nel cervello umano. A causa della sua presenza ubiquitaria, è possibile speculare che in alcuni individui suscettibili la presenza di questo virus come patogeno commensale nel cervello possa contribuire allo sviluppo di alcune patologie del SNC.

MRSV IN PAZIENTI CON SCLEROSI MULTIPLA: CORRELAZIONI CON LA PATOGENESI E LA PROGRESSIONE DELLA MALATTIA

Serra C*, Sotgiu S #, Mameli G, Arru G, Pugliatti M#, Fois ML#, Rosati G#, Dolei A*

* *Sez. Microbiologia Sperim. e Clin., Dip. Scienze Biomediche; #Clinica Neurologica, Univ. Sassari.*

Dato che la prevalenza della sclerosi multipla (MS) in Sardegna è tra le più alte al mondo, abbiamo analizzato questa etnia geneticamente omogenea e relativamente isolata, ad alto rischio di MS, per la presenza di MSRV, un retrovirus MS-associato, della famiglia di retrovirus endogeni HERV-W. Lo studio molecolare ha riguardato pazienti con MS, pazienti con altre malattie neurologiche e donatori sani, in cui è stato cercato MSRV extracellulare, mediante RT-PCR. Virus circolante è stato trovato nel sangue del 13% dei soggetti sani, 100% dei pazienti con MS ($p < 0.000001$) e 40% di pazienti con altre malattie neurologiche ($p < 0.01$). Nel liquor il virus è presente nel 50% dei pazienti all'esordio e nel 100% di quelli con MS per >4 anni; la positività liquorale è correlata alla stadiazione clinica. L'esame neurologico, dopo tre anni, di 15 dei pazienti con MS (al tempo del prelievo per la ricerca di MSRV, erano stati in fase attiva e non trattati: 5 MSRV- e 9 MSRV+). I pazienti sono stati paragonati per numero di sistemi funzionali del CNS, score di EDSS, numero di ricadute/paziente e di ricadute/anno. Mentre i pazienti MSRV- avevano avuto un decorso clinico stabile, quelli MSRV+ lo avevano avuto significativamente più severo. Lo score medio di EDSS ed il numero di sistemi funzionali del CNS erano doppi nei pazienti MSRV+ rispetto agli MSRV- ($p=0.01$). Anche il numero di ricadute/anno era superiore nei pazienti MSRV+; per 6/9 pazienti MSRV+ era stato necessario iniziare la terapia ($p 0.028$). L'analisi di sequenza del virus da campioni casuali ha rivelato caratteristiche di omogeneità, intermedie tra due sequenze in banca dati, in linea con la possibilità di una variante virale sarda. Per studiare il possibile ruolo patogenetico di MSRV, abbiamo valutato gli effetti sulla modulazione di MSRV *in vitro*, da citochine nocive o vantaggiose nella MS. PBMC da sei donatori sani MSRV+ sono stati coltivati come tali o con mitogeni, +/- TNF- α , IL-6, IL-4, IFN- γ e IFN- β . Il rilascio virale è stato valutato mediante RT-PCR semi-quantitativa. I PBMC rilasciano spontaneamente MSRV, che si accumula nel tempo, particolarmente dopo stimolo mitogeno. TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-4 stimolano il rilascio di MSRV da PBMC attivati, mentre IFN- β ha effetti fortemente inibitori. Si ha quindi un parallelismo tra gli effetti di queste citochine su MSRV *in vitro* e su MS *in vivo*, specie di IFN- β , ipotizzando in MSRV un possibile oggetto di terapia nella MS.

IDENTIFICAZIONE DI NUOVI ANTIGENI DI *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* MEDIANTE UNA LIBRERIA DI CDNA ESPOSTA SUL BATTERIOFAGO LAMBDA

G. Garufi*, C. Lo Passo*, I. Pernice*, C. Biondo**, M. Bombaci**, E. Beghetto^, O. Minenkova^, N. Gargano^, G. Teti**, F. Felici*^

*Dipartimento di Scienze Microbiologiche, Genetiche e Molecolari, Facoltà di Scienze M.F.N., Università di Messina,

**Dipartimento di Patologia e Microbiologia Sperimentale – Università di Messina-, ^Kenton Labs, c/o Sigma-Tau, Pomezia, Roma

Cryptococcus neoformans è causa, nell'uomo, di meningo-encefaliti che colpiscono con particolare frequenza pazienti con difetti dell'immunità cellulo-mediata ed è una delle più frequenti cause di morte in pazienti AIDS. E' noto che l'immunità cellulo-mediata gioca un ruolo cruciale nella difesa dell'ospite contro la criptococcosi. Tuttavia molti studi hanno confermato l'importanza dell'immunità umorale, con particolare riguardo al ruolo degli anticorpi diretti contro il polisaccaride capsulare. Pochissimo è noto sull'identità di antigeni proteici in grado di evocare risposte umorali. Tale conoscenza è essenziale per la messa a punto di strategie di immunizzazione attiva (ad esempio mediante vaccini coniugati composti dal polisaccaride capsulare legato a un antigene proteico) o di immunizzazione passiva.

Allo scopo di identificare antigeni proteici di *C. neoformans*, è stata costruita una libreria, in cui i frammenti derivanti dal cDNA del ceppo di *C. neoformans* CAP67 sono stati espressi come proteine di fusione all'estremità N-terminale della proteina D sul capsido del fago lambda. La libreria di cDNA così ottenuta è stata quindi utilizzata in una procedura di selezione per affinità mediante sieri di topi infettati sperimentalmente con il ceppo altamente virulento H66. Questo approccio ha portato alla rapida identificazione di nuove proteine antigeniche che presentano omologia con sequenze nucleotidiche presenti nella banca dati del progetto genoma di *C. neoformans*. In conclusione, le librerie qui descritte, basate su esposizione in fago lambda, si sono dimostrate un mezzo estremamente potente per l'identificazione di antigeni proteici espressi nel corso di infezione. Sono in corso studi per verificare se questi antigeni sono in grado di evocare anticorpi specifici anche in corso di criptococcosi umana e per determinare l'attività protettiva di tali anticorpi.

VACCINAZIONE ANTI-FUNGINA MEDIANTE CELLULE DENDRITICHE

Angela Bacci, Claudia Montagnoli, Katia Perruccio, Silvia Bozza, Roberta Gaziano, Gabriel Nkwanyuo, Francesco Bistoni e Luigina Romani.

Microbiologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università di Perugia, 06122 Perugia.

Le cellule dendritiche (DC) costituiscono una componente essenziale del sistema immune naturale, deputate a percepire stimoli microbici diversi e trasmettere la relativa informazione ai linfociti T. Nei riguardi del fungo *Candida albicans*, abbiamo già dimostrato che DC mieloidi immature fagocitano lieviti e ife del fungo ed inducono risposte antifungine Th diverse. L'ingestione di lieviti attiva le DC per la produzione di IL-12 ed il priming di linfociti Th1, mentre l'ingestione di ife induce la produzione di IL-4 ed il priming di linfociti Th2. In vivo, la generazione dell'immunità protettiva anti-fungina viene indotta in seguito alla somministrazione di DC "pulsate" con lieviti ma non con ife di *Candida*. In questo studio abbiamo valutato l'attività funzionale, *in vitro* ed *in vivo*, di DC transfettate con RNA di lievito o di ifa. E' stato visto che DC, sia midollari che spleniche, transfettate con RNA di lievito: 1) esprimevano mannoproteine fungine sulla loro superficie; 2) andavano incontro a maturazione funzionale, come rivelato dalla aumentata espressione di antigeni MHC di classe II e molecole costimolatorie; 3) producevano IL-12 ma non IL-4; 4) erano capaci di indurre resistenza anti-fungina, Th1-dipendente, se somministrate in vivo in topi non trapiantati e 5) fornivano protezione contro il fungo in topi trapiantati con cellule di midollo allogenico, accelerando il recupero funzionale di linfociti CD4⁺ produttori IFN- γ in risposta al fungo. Tali risultati dimostrano l'efficacia di DC "pulsate" con lieviti o con RNA di lievito di *Candida* come vaccini anti-fungini e suggeriscono il potenziale uso di DC transfettate con RNA microbico quali vaccini anti-infettivi in condizioni che non permettono l'uso di microrganismi attenuati o in caso di mancata disponibilità di antigeni microbici protettivi.

Finalizzato dal Progetto AIDS, contratto 50C.27

ENOLASI E β 1-3 GLUCANASI PARIETALI: RESISTENZA AGLI ANTIMICOTICI E/O FATTORI DI VIRULENZA DI *CANDIDA ALBICANS*?

L. Angiolella¹, A.Palamara¹, G.Gigante¹, M.V. Pasceri¹, B.Maras², F. De Bernardis³, A. Cassone³.

¹Istituto di Microbiologia, Facoltà di Farmacia, Univ. "La Sapienza" Roma.

²Dipartimento di Biologia Molecolare, Univ. "La Sapienza" Roma.

³Istituto Superiore di Sanità, Roma.

Le principali proteine associate al glucano (GAP) identificate nella parete cellulare di *C.albicans* sono l'enolasi di 46 kDa ed una fosfogliceromutasi di 29 kDa. Nostri precedenti studi hanno dimostrato che in presenza di dosi subinibenti di antimicotici (fluconazolo o FK463), cellule lievito di *C.albicans* sensibili, presentano dei cambiamenti nella composizione delle GAP caratterizzate dalla scomparsa quasi totale dell'enolasi e la comparsa di un doppietto proteico di 33-34 kDa corrispondente rispettivamente ad un'altra isoforma della fosfogliceromutasi e alla β 1-3 glucanasi, enzima coinvolto nell'idrolisi del β -glucano.^{1,2} Partendo da queste evidenze sperimentali, ci siamo proposti di caratterizzare ulteriormente la modulazione delle GAP in risposta ad antimicotici e di delinearne il ruolo nei fenomeni di resistenza e/o virulenza. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il trattamento, effettuato su cellule lievito a 37°C, induce la comparsa di una ulteriore banda di 40.6 kDa identificata come una aldolasi, altro enzima del pathway glicolitico. Inoltre, nei ceppi resistenti, le GAP non presentano nessun tipo di modulazione anche dopo trattamento con alte concentrazioni di antimicotici: l'espressione dell'enolasi e dell'aldolasi non subiscono variazioni significative e la β 1-3 glucanasi non viene indotta. L'enolasi parietale dei ceppi resistenti è caratterizzata da un notevole incremento dell'attività enzimatica rispetto a quella dei ceppi sensibili o all'enolasi presente nel citoplasma. Inoltre studi preliminari condotti "in vivo" hanno mostrato un insospettato aumento della virulenza nei ceppi resistenti di *C.albicans*, suggerendo che la modulazione delle GAP può rivestire un ruolo determinante nei meccanismi di resistenza agli antimicotici così come nella patogenesi stessa delle infezioni da *Candida albicans*.

ATTIVITÀ SINERGICA ESERCITATA DAL PEPTIDE N TERMINALE DELLA LATTOFERRINA UMANA IN COMBINAZIONE CON IL FLUCONAZOLO VERSO VARIE SPECIE DI *CANDIDA*

^{1,2}Antonella Lupetti, ¹Akke Paulusma-Annema, ³Mick M. Welling, ¹Heleen Dogterom-Ballering, ⁴Carlo P. J. M. Brouwer, ²Sonia Senesi, ²Mario Campa, ¹Jaap T. van Dissel e ¹Peter H. Nibbering.

¹Department of Infectious Diseases e ³Department of Radiology, Division of Nuclear Medicine, Leiden University Medical Center, Leiden, Olanda, ²Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, Università degli Studi di Pisa, Pisa, ⁴AM Pharma, Bilthoven, Olanda.

L'aumentata frequenza di infezioni sostenute da specie di *Candida* resistenti ai comuni antimicotici ha promosso uno studio sui possibili effetti sinergici esercitati da combinazioni di fluconazolo e peptide N terminale della lattoferrina umana, hLF(1-11), già dimostratosi efficace verso un ceppo di *C. albicans* fluconazolo-resistente. Nel presente studio è stato dimostrato che l'hLF(1-11), a concentrazioni non candidicide, esercita attività candidacida quando utilizzato in combinazione con il fluconazolo. *C. albicans* viene uccisa quando esposta a hLF(1-11) per 5 min e quindi trattata con fluconazolo, mentre non viene osservata alcuna attività candidacida quando il lievito viene esposto al fluconazolo prima del trattamento con il peptide. Risultati simili sono stati ottenuti anche con altre specie di *Candida*, quali *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. È stato analizzato l'effetto dell'azide, un inibitore della respirazione mitocondriale, sull'attività candidacida della combinazione peptide-hLF(1-11)- e fluconazolo verso il ceppo di *C. albicans* fluconazolo-resistente. È stato evidenziato che l'azide inibisce l'attività candidacida della combinazione anche quando viene aggiunto durante la fase effettrice. Come atteso, l'azide inibisce l'accumulo di rodamina 123 nei mitocondri e la produzione e rilascio di ATP da tale lievito dopo esposizione alla combinazione peptide-fluconazolo. In accordo con questi dati, l'ATP ossidato (oATP), antagonista dei recettori per ATP, blocca completamente l'attività candidacida della combinazione peptide-fluconazolo, mentre oATP non blocca tale attività quando aggiunto nella sola fase effettrice. In conclusione, l'attività candidacida della combinazione hLF(1-11) e fluconazolo verso varie specie di *Candida* è iniziata dal peptide attraverso il coinvolgimento dei mitocondri attivati, mentre il fluconazolo è richiesto durante la fase effettrice. L'ipotesi che viene avanzata è che il peptide hLF(1-11) renda *C. albicans* fluconazolo-resistente, suscettibile a tale azolo.

VACCINAZIONE CONTRO L'ASPERGILLOSI INVASIVA MEDIANTE PROTEINE RICOMBINANTI DEL FUNGO ED OLIGODEOSSINUCLEOTIDI COME ADIUVANTI.

Silvia Bozza, Roberta Gaziano, Grayson B. Lipford, Claudia Montagnoli, Angela Bacci, Gabriel Nkwanyuo, Francesco Bistoni e Luigina Romani.

Microbiologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università di Perugia, 06122 Perugia, R&D Coley Pharmaceutical, Langenfeld, Germany

L'aspergillosi polmonare invasiva (IPA) è la più comune manifestazione di infezione da *Aspergillus fumigatus* in pazienti immunocompromessi. Sebbene siano state descritte distinte forme clinico-patologiche di IPA, IPA è un'infezione fulminante ed altamente letale con un accertato tasso di mortalità del 60%. Esistono antigeni ed allergeni di *A. fumigatus* capaci di indurre distinti "patterns" di produzione citochinica. Risultati clinici e sperimentali indicano che la produzione di citochine Th1 o Th2 o di entrambe, in risposta alle diverse proteine di *Aspergillus*, contribuisce alla patogenesi delle malattie infettive, allergiche ed autoimmuni conseguenti all'esposizione al fungo. Noi abbiamo dimostrato che un filtrato acellulare di coltura del fungo (CCFA) agisce come antigene immunodominante in IPA. Cellule dendritiche (DC) "pulsate" con CCFA inducono l'attivazione di cellule CD4⁺ Th1 capaci di conferire resistenza per trasferimento adottivo in topi altrimenti suscettibili. Poiché le DC sono essenziali nell'attivazione della risposta Th al fungo, è legittimo supporre che la capacità di allergeni e di antigeni fungini di attivare DC possa determinare l'intero spettro di reattività osservata in risposta ai differenti allergeni ed antigeni fungini. Nel presente lavoro abbiamo valutato se oligodeossinucleotidi microbici (ODNs) potessero modificare qualitativamente l'attivazione di DC da parte di allergeni di *Aspergillus*. A tal proposito DC sono state "pulsate" con diversi allergeni del fungo, in presenza o meno di ODNs e valutate per il loro stato di attivazione. Abbiamo visto che la combinazione dell'allergene Asp f 16 e di ODNs ha come risultato la maturazione funzionale e l'attivazione delle DC in senso DC1, capaci di indurre il priming di linfociti Th1 e la resistenza al fungo. Pertanto, ODNs agiscono da potenti adiuvanti nella vaccinazione indotta mediante allergeni o antigeni di *Aspergillus*, favorendo in ogni caso l'induzione della risposta Th1.

Finanziato dal Progetto AIDS, contratto 50D.27

IMMUNITÀ PROTETTIVA INDOTTA DA UNA GLUTAMINA SINTETASI DI *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

M. Bombaci, C. Biondo, C. Beninati, L. Messina, G. Mancuso, A. Midiri, R. Galbo e G. Teti
Dipartimento di Patologia e Microbiologia Sperimentale – Università di Messina-

Cryptococcus neoformans, un micete capsulato, è ancora oggi un'importante causa di letalità in pazienti affetti da AIDS, nonostante una riduzione complessiva delle criptococcosi in seguito all'introduzione della terapia antiretrovirale. La terapia antimicotica, in questi pazienti, presenta diverse limitazioni per cui è auspicabile la messa a punto di strategie innovative di immunizzazione.

La glutamina sintetasi (GS) di alcuni microrganismi procarioti (ad es. streptococchi di gruppo B, *Mycobacterium tuberculosis*) è stata messa in relazione alla loro patogenicità. Scopo del presente lavoro è indagare la presenza di GS in *C. neoformans* e valutarne il possibile impiego come vaccino in un modello murino di criptococcosi. Si è proceduto alla clonazione del gene codificante per la GS utilizzando dei primers derivati da sequenze conservate di geni di glutamina sintetasi. Un frammento di DNA (580 bp) veniva amplificato da una libreria di cDNA e sequenziato. Questa sequenza veniva ritrovata nella banca dati del *C. neoformans* Genome Project della Stanford University, Ca. U.S.A. (<http://www-sequence.stanford.edu/group/C.neoformans/index.html>).

Una sonda derivata da questo frammento veniva quindi utilizzata per isolare da una libreria di cDNA il clone recante la sequenza del gene codificante per la proteina GS (GenBank, *fgs*, accession number: AJ414581). L'intero ORF codifica per una proteina di 356 AA avente un peso molecolare di circa 40kDa. Allo scopo di ottenere la proteina codificata dal gene della GS, quest'ultimo è stato amplificato dal clone recante l'intera sequenza del gene. Il prodotto così ottenuto è stato clonato nel vettore di espressione pET 21b e il costrutto usato per trasformare cellule di *E. coli* ceppo BL21 (DE3).

La proteina ricombinante (rGS) veniva purificata e utilizzata per immunizzare topi BALB/c che venivano successivamente infettati con un ceppo altamente virulento (H99) di *C. neoformans*. Nei topi immunizzati con rGS si osservava una marcata attività protettiva evidenziata da una sopravvivenza maggiore e da un ridotto numero di CFU nel fegato e nella milza. La GS qui descritta potrebbe rivelarsi utile in strategie di immunizzazione adottiva o attiva in soggetti affetti da criptococcosi.

CONFRONTO DI TRE METODICHE PER LA VALUTAZIONE DI SENSIBILITÀ A FLUCONAZOLO NEI CONFRONTI DI ISOLATI DI LIEVITI DA MICOSI PROFONDE.

C.M. Maida¹, M.E. Milici¹, D. Arzeni², F. Barchesi², M. Marocci², G. Scalise²

¹Dipartimento di Igiene e Microbiologia, Università degli Studi di Palermo

²Istituto di Malattie Infettive e Medicina Pubblica, Università degli Studi di Ancona

Negli ultimi anni si è verificato un aumento di infezioni fungine sistemiche causate da specie *non-albicans*. Nell'ambito di queste specie non è infrequente il riscontro di isolati con ridotta sensibilità ai farmaci antifungini soprattutto al fluconazolo, ampiamente utilizzato nella pratica clinica.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di confrontare i pattern di sensibilità a Fluconazolo (FLC) nei confronti di isolati clinici di lieviti ricorrendo a tre differenti metodiche: la diluizione in brodo, secondo il micrometodo raccomandato dall'NCCLS (metodica di riferimento); la metodica sensititre e la disco-diffusione eseguita in Muller-Hinton Agar.

Sono stati considerati 22 isolati clinici di lievito, tutti da siti profondi così distribuiti: *C. albicans* (15), *C. tropicalis* (4), *C. parapsilosis* (1), *C. glabrata* (1), *C. lipolitica* (1 isolato/specie).

In accordo con quanto riportato nel documento NCCLS, gli isolati sono stati considerati sensibili (S) al Fluconazolo se la MIC era $\leq 8,0 \mu\text{g/ml}$, sensibili dose dipendente (SDD), se la MIC era compresa tra 16 e $22 \mu\text{g/ml}$ e resistenti (R) quando la MIC risultava $\geq 64 \mu\text{g/ml}$. Analogamente gli isolati venivano considerati S, SDD, R se i diametri di inibizione della crescita erano rispettivamente ≥ 19 mm, compresi tra 13 e 18 mm e ≤ 12 mm.

I valori ottenuti dalle metodiche alternative erano considerati in accordo alla metodica NCCLS quando ricadevano nella stessa categoria (es. NCCLS $8,0 \mu\text{g/ml}$, sensititre $2,0 \mu\text{g/ml}$, e disco-diffusione 28 mm, 100% di accordo). Le MIC di Fluconazolo eseguite secondo la metodica standard presentavano un range compreso tra $\leq 0,125$ e $>64 \mu\text{g/ml}$. Il 73 % degli isolati risultava sensibile al FLC, mentre il 27 % risultava resistente. In generale la disco-diffusione iperstimava la sensibilità a discapito della resistenza.

Analizzando i dati in relazione alla specie, si è osservato un 100 % di corrispondenza tra le due metodiche alternative all'NCCLS per i 15 isolati di *C. albicans* (13 isolati S e 2 R).

Al contrario per le specie *non-albicans* la percentuale di corrispondenza si riduceva al 57 e 71 % rispettivamente, con la sensititre e la disco-diffusione.

In generale i nostri dati evidenziano la possibilità di utilizzare metodiche alternative all'NCCLS nel caso in cui il Fluconazolo si testasse su *C. albicans*, ma per specie diverse bisogna porre particolare attenzione sulla scelta del test da utilizzare.

IMMUNITÀ ANTI-CANDIDA NELLA VAGINITE SPERIMENTALE

De Bernardis F.1, Boccanera M.1, Adriani D.1, Lucciarini R.3, Amantini C.3, Morrone S.2, Santoni G.3, Cassone A.1
Istituto Superiore di Sanità1, Università La Sapienza2, Roma, Università degli Studi di Camerino3, Camerino

La candidiasi vulvovaginale è un' infezione frequente che colpisce molte donne ed alcune in forme ricorrenti e refrattarie alla terapia antimicotica. La patogenesi di questa frequente infezione non è chiara. È stato suggerito che l'immunità locale più che quella sistemica esercita un ruolo critico, ma i meccanismi alla base della risposta difensiva locale non sono stati ancora definiti.

Nel nostro modello sperimentale (vaginite in ratte ovariectomizzate e mantenute sotto estrogeni) si può indurre protezione locale senza significative risposte periferiche (vedi De Bernardis et al. Infect.Immun. 2000, 68:3297-3304). Abbiamo quindi investigato il ruolo protettivo di differenti classi di linfociti mediante trasferimento adottivo di linfociti vaginali (LV) totali o purificati e separati in CD3⁺, CD3⁻CD5⁺Ig⁺, CD4⁺ o CD8⁺ provenienti da animali immunizzati.

Gli animali inoculati endovena con LV totali o con cellule T CD3⁺ derivanti da ratte immuni (inoculate 3 volte consecutive con *C.albicans*) hanno mostrato una più rapida e significativa eliminazione del fungo dalla vagina rispetto agli animali trattati con LV provenienti da animali non immunizzati.

Il trasferimento di cellule T CD4⁺ od anche di una particolare classe di linfociti B vaginali (CD3⁻CD5⁺Ig⁺) trasferiva un elevato livello di protezione. Un basso ma ancora significativo livello di protezione era anche trasferito dalle cellule CD8⁺. Questi studi dimostrano che una risposta anti-*Candida* cellulo-mediata viene specificatamente indotta ed espressa in loco, a livello vaginale, senza indurre una risposta periferica, in questa risposta, le cellule T CD4⁺ e le cellule B CD5⁺ sembrano svolgere un ruolo preminente.

TERAPIA DI CANDIDOSI SPERIMENTALI VAGINALI E SISTEMICHE CON UN MIMOTOPO KILLER

S. Conti¹, W. Magliani¹, A. Salati¹, L. Bracci², L. Lozzi², P. Neri², D. Adriani³, F. De Bernardis³, A. Cassone³, L. Polonelli¹

Sezione Microbiologia, Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Università degli Studi, Parma (1), Sezione di Chimica Biologica, Dipartimento di Biologia Molecolare, Università degli Studi, Siena (2), Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica, Istituto Superiore di Sanità, Roma (3).

Lo studio della sequenza della regione variabile di un anticorpo antiidiotipico ricombinante a singolo filamento (KTscFv), rappresentante l'immagine interna di una tossina killer di lievito, in grado di esplicare una significativa attività candidacida, ha consentito di sintetizzare un decapeptide ancora in grado di esplicare tale attività. La sostituzione con alanina di uno dei residui aminoacidici costituenti la molecola originaria ha consentito di ottenere un decapeptide modificato (mimotopo killer, KM), in grado di esercitare una attività candidacida *in vitro* significativamente più elevata, con una IC50 pari a 0,056 µM.

Tale molecola è stata valutata per la sua attività terapeutica nei confronti di candidosi vaginale e sistemica, in modelli animali (ratto e topo, rispettivamente) ben consolidati.

La somministrazione intravaginale (iv) di KM susseguente all'inoculo sperimentale iv di cellule di *Candida albicans*, in ratto, si è dimostrata altamente efficace nell'eradicazione dell'infezione da tutti gli animali trattati, in modo del tutto analogo a quanto osservato con un trattamento con fluconazolo. Una analoga efficacia terapeutica era rilevabile anche nel trattamento di infezioni sperimentali sostenute da un ceppo di *C. albicans* resistente al fluconazolo, mentre l'infezione sperimentale si dimostrava persistente nel 100% degli animali non trattati o di quelli trattati con un peptide "scramble" (SP), utilizzato come controllo.

La somministrazione intraperitoneale di KM a topi Balb/c o topi SCID, preventivamente infettati sperimentalmente per via endovenosa con inoculi letali di cellule di *C. albicans*, determinava un prolungamento altamente significativo (oltre i 60 giorni) del tempo mediano di sopravvivenza, in più dell'80% degli animali trattati, mentre tutti gli animali non trattati o trattati con SP morivano entro 3-5 giorni dall'inoculo letale.

Un decapeptide sintetico derivato da un KTscFv candidacida può mantenere una potente attività fungicida, proponendosi quale potenziale agente terapeutico utilizzabile nel trattamento di infezioni vaginali e sistemiche sostenute da *C. albicans*, uno dei principali agenti patogeni opportunisti dell'uomo.

ESPRESSIONE DEI GENI REGOLATORI DEL RIMODELLAMENTO OSSEO OPGL ED OPG IN PRESENZA DI HIV E DI CITOCHINE PROINFIAMMATORIE

A. Biolchini, M. Piras, C. Serra, A. Dolei

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

Nel rimodellamento osseo un regolatore essenziale è rappresentato da OPGL (osteoprotegerin ligand), che svolge inoltre un ruolo rilevante nelle interazioni tra cellule T e cellule dendritiche ed ha un'azione diretta sulle cellule epiteliali mammarie, per la formazione delle strutture lobulo-alveolari mammarie *in vitro*. OPGL prodotto da cellule T attivate ha un ruolo diretto sull'osteoclastogenesi, che porta a alterazioni ossee in malattie autoimmuni, neoplasie, asma e infezioni virali croniche, come l'AIDS. In questa malattia, inoltre, sono frequenti le alterazioni ossee a seguito di terapia antiretrovirale (HAART). In gravidanza, la mancanza di OPGL blocca la formazione delle strutture lobulo-alveolari mammarie, con un'azione diretta sulle cellule epiteliali mammarie (aumentata apoptosi e ridotta proliferazione); inoltre l'inibizione del legame di OPGL al suo recettore RANK tramite osteoprotegerina (OPG) previene il processo osteoporotico.

In corso di infezione da HIV, soprattutto a seguito di terapie HAART, si riscontrano fenomeni osteoporotici; per chiarire se il sistema OPGL/OPG intervenga nei meccanismi patogenetici innescati da HIV, è stata determinata l'espressione di OPGL e OPG in cellule umane circolanti (PBL attivati da mitogeni) ed epiteliali (mammarie e di altra origine) sia di base che dopo infezione con HIV T-Tropico (HIV-1_{PT}) e M-tropico (HIV-BaL) o dopo trattamento con citochine inducibili da HIV. L'RNA delle colture è stato esposto ad RT-PCR con primers specifici per OPGL, OPG e per i geni invariati b-actina e gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi.

I risultati ottenuti indicano che c'è espressione basale di entrambi i geni in tutte le cellule saggiate, generalmente con una maggior espressione di OPG rispetto ad OPGL. In tutti i sistemi saggiati, entrambi i geni sono risultati modulabili dall'infezione produttiva con HIV e dal trattamento con TNF α , con un picco dopo 48 ore. Dati preliminari, da confermare, indicherebbero nei PBL e nelle cellule macrofagiche THP1 una modulazione differenziale dell'espressione dei due geni, per cui in corso di infezione da HIV sembrerebbe prevalere l'effetto sul gene "pro-osteoclastogenesi" OPGL.

BIO₂REMEDIATION: TRATTAMENTO DI OSSIGENAZIONE FORZATA "IN SITU" DEL SEDIMENTO IN UNA DARSENA DELLA ZONA INDUSTRIALE DI PORTO MARGHERA - VENEZIA

Carlo Morucchio¹, Maurizio Bonardi², Sergio De Sanctis³, Giampietro Ravagnan¹

1 – Dip. di Scienze Ambientali, Università di Venezia Ca' Foscari

2 – ISDGM, Consiglio Nazionale delle Ricerche

3 – Gruppo SAPIO Spa

Scopo del presente lavoro è quello di valutare l'efficacia del trattamento di bio₂remediation mediante ossigenazione forzata, attraverso l'analisi sia dei metalli pesanti che dei PCB riscontrati in carote di sedimento prelevate prima, durante e dopo la prima fase di sperimentazione. Questo tipo di tecnologia è stato messo a punto dalla SAPIO s.r.l.

La prima fase della sperimentazione si è protratta dal 7 agosto al 22 novembre 2001. L'impianto è stato attivato alle ore 20.00 e spento alle ore 07.00 di ciascun giorno per tutta la durata della sperimentazione.

L'area di studio è ubicata nella darsena, parte terminale del Canale Industriale Sud, nell'area Industriale di Marghera. L'area prescelta ha una superficie di circa 10 ha ed una profondità media di circa 8 metri, non subisce apporti di acqua dolce ed è soggetta all'azione delle maree. I sedimenti di fondo, specie nella parte centrale, subiscono un notevole rimaneggiamento causato dalle navi che entrano in darsena per scaricare i loro carichi e dai rimorchiatori utilizzati per le manovre di attracco.

Ogni carota è stata subcampionata nei primi 20 cm in 10 campioni di 2 cm di spessore, e in profondità ogni 10 cm sono stati prelevati campioni di 4 cm di spessore. I sedimenti delle carote estratte prima, durante e dopo l'aerazione forzata non hanno indicato variazioni significative della e della composizione mineralogica. Per quanto riguarda il contenuto in metalli pesanti è evidente un trend negativo tra l'inizio e la fine della sperimentazione. Più in particolare si nota una netta diminuzione dei contenuti medi in Cu, Pb, Zn, Ni, Cd e Cr nei sedimenti superficiali (primi 6 cm) del sito A che sembra essere meno interessato da processi di rimaneggiamento. Per quanto riguarda l'analisi dei PCB è stata evidenziata, nei primi strati di sedimento (da 0 a -4 cm di profondità), una percentuale di diminuzione relativa che raggiunge il 50% tra prima e dopo l'effettuazione dell'aerazione forzata. In generale tutte le 6 famiglie hanno subito una diminuzione della concentrazione, ma soprattutto i tri- e gli octa-clorobifenili. E' attualmente in corso la seconda fase della sperimentazione che ha preso il via all'inizio di giugno e si concluderà verso la fine di ottobre. Sono quindi in corso di effettuazione i carotaggi, i campionamenti e le analisi prima e dopo la seconda fase di aerazione forzata. Dalla elaborazione di questi ultimi dati sarà possibile determinare la "permanenza dell'effetto aerazione-ossigenazione sui sedimenti di fondo ed anche verificare i risultati ottenuti nella prima fase della sperimentazione.

INFEZIONE DELLE ALTE VIE RESPIRATORIE

P. M. Furneri

Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche, Università di Catania

“Le infezioni acute del tratto respiratorio sono la terza causa di morbilità e mortalità in tutto il mondo. Nel 1996 sono stati registrati 394 milioni di casi di infezioni acute delle basse vie respiratorie e 3,9 milioni di morti, soprattutto in bambini ed anziani.” R.N. Grünemberg, 1999

Le infezioni del tratto respiratorio superiore rappresentano l'evento patologico più frequente. Non presentano, in genere, gravi conseguenze cliniche, sebbene interferiscano sulla qualità di vita e comportino costi medico-sociali elevati.

I patogeni che interessano le vie aeree superiori sono virus, micoplasmi e batteri. Si localizzano a diversi livelli determinando quadri patologici frequentemente contigui; la localizzazione può essere sincrona, oppure avvenire in successione. Quelle che si vengono a stabilire sono essenzialmente patologie comunitarie le quali presentano diversa eziologia per fasce di età.

In età pediatrica le fasce più colpite sono la prima e la seconda infanzia, quando, solitamente, il bambino frequenta l'asilo nido e la scuola materna, luoghi in cui l'alta concentrazione facilita il contagio e moltiplica le possibilità di trasmissione.

Dal punto di vista della terapia le infezioni delle alte vie respiratorie rappresentano il 33 % delle prescrizioni mediche.

Le principali patologie dovute a batteri sono la faringite, la laringite acuta, l'otite (esterna e media), la mastoidite, la sinusite, l'epiglottite, più rara, e le cosiddette infezioni del cavo orale e del collo.

L'eziologia batterica comprende numerosi batteri Gram positivi, Gram negativi, micoplasmi e in minor misura anche le clamidie.

Dal punto di vista del microbiologo clinico la diagnosi eziologica, è raramente effettuabile, anche in ambiente ospedaliero, e la terapia antibiotica è prevalentemente fondata su criteri empirici di scelta.

In base all'eziologia i farmaci di scelta possono variare, ma, comunque sempre all'interno dei beta-lattamici e dei macrolidi.

PRESENTAZIONE DEL NUOVO PROGETTO @RES

R. Mattina

Istituto di Microbiologia – Università di Milano

Il progetto @res è il proseguimento dello studio, inizialmente denominato GISPYO (Gruppo Italiano *Streptococcus pyogenes*). Quest'ultimo si poneva come obiettivo il monitoraggio sul territorio delle resistenze dello *S. pyogenes* nei confronti di diversi antibiotici avvalendosi di internet per rendere più rapida la raccolta dei dati e lo scambio di informazioni tra le diverse microbiologie cliniche presenti in Italia.

Nei primi due anni di attività, oltre 70 laboratori di microbiologia clinica, distribuiti su tutto il territorio nazionale, hanno immesso nel sito Gispyo oltre 13.000 risultati di antibiogrammi eseguiti su altrettanti ceppi di *S. pyogenes* isolati quasi tutti da tamponi faringei di pazienti ambulatoriali.

Visto il crescente interesse dimostrato da molti colleghi microbiologi si è deciso di includere, nel monitoraggio delle resistenze, altri batteri responsabili di infezioni delle vie respiratorie acquisite in ambiente comunitario quali *S. pneumoniae* (per il quale è stato aperto un nuovo sito internet denominato GISPNEUMO), *H. influenzae* e *M. catarrhalis*.

I dati raccolti sino ad oggi nei siti Gispyo e Gispneumo non sono stati sottoposti ad alcuna verifica per cui si sono evidenziati alcuni errori presumibilmente dovuti o da una non corretta identificazione del microrganismo o, più banalmente, da un errato inserimento del dato al computer.

Questi errori hanno inficiato il dato complessivo e in seguito a ciò si è deciso di istituire una rete di coordinatori regionali e nazionali che assolvessero a questo compito.

Sono state riviste le linee guida per l'isolamento, l'identificazione e la determinazione della sensibilità “in vitro” agli antibiotici di tutti i microrganismi presi in considerazione che verranno presentate in occasione di questo convegno.

Inoltre, i laboratori che parteciperanno allo studio, periodicamente dovranno effettuare dei controlli di qualità.

I coordinatori valideranno i dati inseriti nel sito e subito dopo averli validati verranno messi a disposizione dei microbiologi clinici ed anche dei medici che operano nel territorio in modo da far conoscere loro, quasi in tempo reale, la situazione delle resistenze dei principali patogeni respiratori isolati in comunità sia a livello loco-regionale che nazionale.

“INVECCHIAMENTO” IN *HELICOBACTER PYLORI*

L. Cellini¹, G. Spoto², E. Di Campli¹, M. Di Candia¹, I. Robuffo³, G. Donelli⁴

Dipartimenti di ¹Scienze Biomediche e ²Scienze Odontostomatologiche, Facoltà di Medicina, Chieti - ³Istituto di Citomorfologia, CNR, Chieti - ⁴Dipartimento di Ultrastrutture, ISS, Roma
lcellini@dsb.unich.it

Razionale. Crescente interesse ha suscitato, negli ultimi anni, lo studio della sopravvivenza di *Helicobacter pylori* in terreni nutritivi dopo prolungata incubazione.

Nel presente lavoro abbiamo studiato l'invecchiamento di *H.pylori* in brodocolture ottenute da un ceppo di 1° isolamento clinico e dopo passaggi seriali su terreno solido, rilevando: i) le modificazioni morfologiche dei germi isolati e/o raggruppati in “cluster”, ii) la presenza di *cagA* come indicatore della persistenza della patogenicità, iii) i valori di cGMP come regolatore del ciclo cellulare e marker dello “stato dormiente”.

Metodi. Per gli esperimenti è stato utilizzato *H.pylori* C₁P₁T₀ di 1° isolamento e dopo 10 e 20 passaggi su terreno solido. Le colonie recuperate da piastra sono state seminate in terreno liquido e incubate in microaerofilia a 37°C per 7 giorni. I controlli sono stati effettuati al tempo 0 e dopo 3 e 7 giorni. I cambi morfologici dei batteri invecchiati sono stati analizzati con microscopia ottica ed elettronica. La presenza e l'espressione del gene *cagA* sono state valutate rispettivamente con l'amplificazione di un frammento di 298 pb e con l'analisi in SDS-PAGE e Western blotting. L'estrazione e l'analisi del cGMP sono state effettuate mediante HPLC.

Risultati e Conclusioni. Il cambiamento morfologico principale osservato nei batteri provenienti da brodocolture allestite con il ceppo subito dopo l'isolamento, è stato il passaggio dalla morfologia bacillare a quella coccoide, insieme ad un aumento di cGMP da 1 a 2.25 nmoli/mg di proteine nei primi 7 giorni d'incubazione. Cambi morfologici e fisiologici simili, accompagnati da clustering più marcato, sono stati osservati nelle colture ottenute dopo 10 e 20 passaggi, con valori di cGMP di 1.25 e 0.76 dopo 7 giorni. A 3 giorni, queste colture erano caratterizzate dalla prevalenza di cocchi e di grandi “cluster” che, a 7 giorni, evolvevano in una rete di aggregati più piccoli. Inoltre, in tutte le condizioni sperimentali valutate, il rilievo di una banda di 298 pb ha confermato la presenza del gene *cagA* e l'analisi in Western blotting ha dimostrato la sua costante espressione nonostante i profili proteici siano risultati diversi.

Dai dati ottenuti si può concludere che i differenti morfotipi espressi durante il ciclo vitale di *H.pylori*, insieme con i significativi riarrangiamenti metabolici osservati, rappresentano una risposta del batterio finalizzata alla conservazione della specie.

“LEPTOSPIRA SPP. – RDNA 16S”: UN NUOVO SAGGIO MOLECOLARE PER LA DIAGNOSI DI LABORATORIO DI LEPTOSPIROSI.

Calderaro A., Dettori G., Piccolo G., Bommezzadri S., Ragni P., Conter M.¹, Zuelli C., Guégan R., 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.

La diagnosi di laboratorio di leptospirosi è basata sulla ricerca diretta dell'agente eziologico mediante esame colturale e saggio di microagglutinazione: entrambi sono di lunga durata, carenti di specificità e sensibilità. Lo sviluppo di metodiche molecolari basate sulla reazione polimerasica a catena (PCR) ha permesso di migliorare la sensibilità, la specificità e la rapidità della diagnosi di leptospirosi. Allo scopo di rendere di più semplice e rapida esecuzione e di standardizzare l'indagine di nested-PCR attualmente in uso in questo Laboratorio Regionale per la Leptospirosi, abbiamo valutato un nuovo saggio “*Leptospira* spp. – rDNA 16S” prodotto da Amplimedical S. p A. per l'amplificazione e rivelazione del DNA delle leptospire.

Il saggio “*Leptospira* spp – rDNA 16S” è stato valutato utilizzando campioni simulati ottenuti aggiungendo aliquote (500 µl) di sangue intero e aliquote (100 µl) di colture pure di ceppi di riferimento di leptospire patogene e non patogene. Le sospensioni di leptospire così ottenute sono state sottoposte a diluizioni seriali. Aliquote (200 µl) della sospensione non diluita e di ognuna delle diluizioni, sono state analizzate con il saggio molecolare. Il saggio prevede l'estrazione del DNA, l'amplificazione di un frammento di 289 pb del DNA 16S delle leptospire e la rivelazione del prodotto dell'amplificazione. Le prove sono state eseguite sui campioni saggiati comparativamente al sistema in uso nel nostro laboratorio (anche questo prevede le fasi di estrazione, amplificazione e rivelazione).

Il saggio “*Leptospira* spp – rDNA 16S” ha mostrato di essere sensibile poiché ha permesso di rivelare il DNA di leptospire estratto da campioni contenenti solo 28 cellule/ml e specifico: tutti i controlli negativi sono risultati negativi. Il saggio Nested-PCR di riferimento, da noi “allestito in casa”, ha consentito di rivelare il DNA di leptospire estratto da campioni contenenti solo 4 cellule/ml. Tuttavia, come molti dei sistemi “allestiti in casa”, presenta diversi limiti: non è standardizzato, è complesso e prevede una lunga esecuzione. Per questo potrà essere vantaggiosamente sostituito dal nuovo saggio “*Leptospira* spp – rDNA 16S” che è standardizzato, razionalmente concepito ed efficace.

1-ALCHIL-3-ARIL-4[α -(1H-IMIDAZOL-1-IL)ARILMETIL]PIRROLI: UNA NUOVA CLASSE DI POTENTI AGENTI ANTI-CANDIDA

Roberto Di Santo,^a Roberta Costi,^a Michela Forte,^a Marino Artico,^a

Letizia Angiolella,^b Giovanna Gigante,^b Maria Vittoria Pasceri,^b Anna Teresa Palamara,^b

^a“Istituto Pasteur- Fondazione Cenci Bolognetti” Dipartimento di Studi Farmaceutici,
Università di Roma “La Sapienza”, P.le A. Moro 5, Roma, Italy

^bIstituto di Microbiologia, Università di Roma “La Sapienza”, P.le A. Moro 5, Roma, Italy

L'emergenza sempre più frequente di infezioni opportunistiche legate a patologie immunosoppressive rende indispensabile un approfondimento dello studio nel settore della progettazione e sintesi di nuovi farmaci. Tra i derivati appartenenti al gruppo degli antifungini azolici, sono stati così realizzati vari composti che sono successivamente entrati nella pratica clinica (ad esempio il bifonazolo, il miconazolo, il fluconazolo, ecc.). Lo studio strutturale su questa classe di farmaci ha portato al riconoscimento del ruolo fondamentale che svolge l'unità farmacogenica 1-benzilimidazolica.

Negli ultimi dieci anni il nostro gruppo di ricerca si è notevolmente impegnato nella ricerca su nuovi antifungini. Tra le varie classi di antimicotici progettati, sono stati sintetizzati e testati un gruppo di 3-aril-4[α -(1H-imidazol-1-il)arilmetil]pirroli che sono risultati potenti agenti anti-*Candida*.¹⁻³ Da un punto di vista strutturale, questi antimicotici presentano sia l'unità 1-benzilimidazolica, tipica di molti antifungini azolici, che la porzione arilpirrolica, presente nell'antibiotico antimicotico Pirrolnitrina (Pyroace, Micutrin).

Nel nostro studio abbiamo sintetizzato e saggiato alcuni N-alchil derivati dei 3-aril-4[α -(1H-imidazol-1-il)arilmetil]pirroli contro vari ceppi di *Candida albicans* al fine di approfondire le relazioni tra struttura chimica ed attività microbiologica di questa classe di composti. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che alcuni dei gruppi alchilici legati all'azoto pirrolico inducono un incremento significativo dell'attività antifungina del farmaco rispetto ai derivati “classici” testati in precedenza. Ulteriori studi tesi ad identificare l'esatta correlazione struttura-attività sono in corso attualmente.

ALLA RICERCA DI UNA COMUNE ORIGINE TRA ENTEROCOCCHI RESISTENTI AI GLICOPEPTIDI DI ORIGINE UMANA ED ANIMALE.

Campanile Floriana¹, Borbone Sonia¹, Bongiorno Dafne¹, Edoardo Carretto², Daniela Barbarini², Letizia Pillitteri², Lorenza Perversi² e Stefania Stefani¹

Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Ginecologiche, Università di Catania e ²Laboratorio di Diagnostica Infettivologica ed Epidemiologia Molecolare, Dipartimento di Malattie Infettive, IRCCS Policlinico “San Matteo”, Pavia.

L'isolamento di VRE da sorgenti non umane, ha fatto ipotizzare che gli allevamenti di animali destinati alla produzione alimentare, potessero costituire dei reservoirs per tali microrganismi, selezionati da antibiotici di struttura glicopeptidica (avoparcin) utilizzati come “grown promoter”. Soprattutto in Europa è stata invocata la catena alimentare come via mediante la quale i VRE possono essere trasmessi all'uomo. Allo scopo di individuare le diversità molecolari e le correlazioni evolutive di VRE di diversa origine, sono stati inclusi nello studio 46 ceppi di enterococchi (27 *E.faecium*, 15 *E. faecalis* e 4 *E. durans*) con fenotipo VanA, isolati da sorgenti diverse (25 VRE isolati da polli e cani e 22 di origine umana). Sono state utilizzate diverse metodologie molecolari quali: ribotipizzazione automatica mediante Riboprinter (Qualicon), PFGE, analisi di popolazione e RFLPs del Tn1546.

Gli esperimenti di ribotipizzazione mediante uso combinato degli enzimi *EcoRI* e *BamHI* ci ha permesso di distinguere 18 gruppi di isolati per *E. faecium*, 12 gruppi per *E. faecalis*, 3 gruppi per *E. durans*. *EcoRI* ha evidenziato un potere discriminatorio maggiore rispetto a *BamHI* per *E. faecalis*, mentre il contrario è avvenuto per *E. faecium*. La comparazione dei profili di macrorestrizione mediante PFGE con *SmaI*, ci ha consentito di individuare 31 diversi pulsotipi, (12 tra gli *E. faecalis*, 2 tra gli *E. durans* e 17 tra gli *E. faecium*). Dall'analisi dei dendrogrammi è emerso che tutti i VRE in studio divergono, in prossimità dell'origine, in pochi clusters principali, probabilmente in relazione alla specie ed alla sorgente di isolamento e si distribuiscono in più rami, sinonimo di un'origine policlonale. Dall'analisi dei RFLPs di Tn1546 è emerso che l'elemento subisce le stesse modificazioni (delezioni delle flanking-regions, inserzioni di IS1216V) in tutte le specie enterococciche, indipendentemente dalle provenienze.

In conclusione non è stata dimostrata nessuna correlazione genica tra ceppi di origine umana e veterinaria, sia utilizzando la tecnica di ribotipizzazione automatica che mediante PFGE, mentre l'esistenza di Tn-types comuni, sviluppatasi ed evolutisi in modo indipendente, fa ipotizzare una origine comune del cluster genico *vanA*.

ANALISI DELLA REGIONE RD2 DEL GENE *prtF1* IN CEPPI FARINGEI DI *STREPTOCOCCUS PYOGENES* ISOLATI IN ITALIA, ERITROMICINO-RESISTENTI E INVASIVI PER CELLULE RESPIRATORIE

Cinzia Spinaci, Gloria Magi, Eleonora Giovanetti, Pietro E. Varaldo, Bruna Facinelli
Istituto di Microbiologia e Scienze Biomediche, Università di Ancona

La stretta ed insospettata associazione tra eritromicina-resistenza e capacità di invadere cellule respiratorie, dimostrata recentemente dal nostro gruppo in ceppi faringei di *Streptococcus pyogenes* isolati in Italia, può significare che i ceppi invasivi e resistenti possono essere più difficili da eradicare, in quanto sfuggono ai β -lattamici grazie all'intracellularità e ai macrolidi grazie alla resistenza. Un aspetto sorprendente di questa associazione è il fatto che i ceppi eritromicina-resistenti ed invasivi sono risultati alquanto eterogenei, appartenendo a differenti fenotipi e genotipi di resistenza. In questo studio abbiamo analizzato la regione RD2 che codifica per il dominio ripetuto di legame alla fibronectina del gene *prtF1* (responsabile della capacità invasiva) di 77 ceppi faringei invasivi di *S. pyogenes* (66 eritromicina-resistenti ed 11 eritromicina-sensibili). Lo studio è stato condotto mediante PCR utilizzando primer adiacenti alla regione RD2 (gli amplificati attesi dipendevano dal numero di ripetizioni, una ripetizione potendo essere di 96 o 111 bp) e mediante analisi di restrizione con l'enzima *HaeIII*. L'ampiezza degli amplificati (da 111 a circa 550 bp) suggeriva che il numero di ripetizioni poteva variare da 1 a 5; più frequentemente si sono ritrovate 4, 3, o 1 ripetizioni. Tra i ceppi con resistenza inducibile, tutti quelli in possesso del gene *ermB* ($n = 13$) avevano 4 ripetizioni RD2, mentre tutti quelli in possesso del gene *ermTR* ($n = 21$) avevano 3 ripetizioni. Il quadro era molto più vario tra i ceppi con resistenza costitutiva ($n = 10$); tra i ceppi di fenotipo M ($n = 22$), tutti in possesso del gene *mefA*, la maggior parte dei quali avevano 1 ripetizione; e tra i ceppi eritromicina-sensibili. L'analisi di restrizione ha mostrato differenze negli amplificati con 3 e 4 ripetizioni ottenuti dai ceppi resistenti. La presenza di diversi geni *prtF1* nei ceppi resistenti e invasivi di *S. pyogenes* isolati in Italia sottolinea ancora una volta la loro eterogeneità e indica che occorrono ulteriori indagini per chiarire le ragioni alla base dell'associazione tra resistenza e invasività.

ANALISI DELL'ANTIBIOTICO-RESISTENZA DI *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ISOLATI NEL SUD ITALIA: RISULTATI DELLO STUDIO S.E.M.P.RE. 2000-2002.

A. Speciale, F. Caccamo, I. Milazzo, R. Musumeci, M. Pisano, C. Torrisi, G. Nicoletti
Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche, Sezione di Microbiologia, Università di Catania.

La resistenza alla penicillina e la resistenza multipla di *Streptococcus pneumoniae* registrate ormai in tutto il mondo, hanno reso indispensabile il monitoraggio di questo fenomeno su larga scala.

Nel triennio 2000-2002, in Italia, lo Studio S.E.M.P.RE. ha monitorato l'andamento della sensibilità di *S. pneumoniae* a varie classi di antibiotici. Al progetto hanno partecipato 20 Centri di cui 7 al Nord, 6 al Centro e 7 al Sud. Nei singoli Centri partecipanti la sensibilità a beta-lattamici, macrolidi, fluorochinoloni, glicopeptidi, tetraciclina, cotrimossazolo, cloramfenicolo e rifampicina è stata determinata mediante il metodo E-test; tre Centri coordinatori (Genova, Ancona, Catania) hanno anche determinato la MIC mediante la tecnica della microdiluizione in brodo (NCCLS 2000-2001). La sierotipizzazione di tutti i ceppi isolati nel triennio è stata eseguita nel Centro di Genova mediante la reazione di rigonfiamento capsulare.

Al Sud i Centri partecipanti hanno contribuito allo studio isolando 501 ceppi di *S. pneumoniae* di cui 210 nel 2000, 159 nel 2001 e 132 nel 2002.

I dati di sensibilità di *S. pneumoniae* nei confronti degli antibiotici saggiati con ambedue i metodi sono riportati in tabella.

Percentuale di sensibilità (%S) di *S. pneumoniae* a vari antibiotici

PEN	AMX	CXM	CEC	CTX	ERY	LEV	2000	MIC	86,2	100
92,9	n.d.	94,3	56,7	100	E-Test	83,8	99	92,1	n.d.	97
55,1	100	2001	MIC	90	98,6	-*	85,7	-*	51,4	**
100	E-Test	83	100	95,6	91,8	96,3	50,3	**	100	2002
MIC	90,1	99,2	-*	89,4	-*	53,8	**	97,8	E-Test	91,5
99,3	93,6	90,1	95,8	51,1	**	97,2	*	nel 2001 e	2002	cefuroxime e cefotaxime non sono stati saggiati con il metodo della broddiluizione

** al posto di eritromicina è stata saggiata claritromicina

L'attendibilità dei due metodi utilizzati per la determinazione della sensibilità in vitro di *S. pneumoniae* è confermata dalla quasi sovrapposibilità dei dati ottenuti nel triennio 2000-2002.

Nel Sud Italia, la resistenza alla penicillina mostra un decremento dal 13,8% (7,1% I, 6,7% R) nel 2000 al 9,9% (3,8% I, 6,1% R) nel 2002. La resistenza ai macrolidi è sempre molto elevata. Levofloxacina ed amoxicillina sono risultate le molecole più attive.

ANALISI MOLECOLARE E POLIMORFISMO DEI GENI DEL LOCUS DI PATOGENICITÀ (PALOC) DI *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

Patrizia Spigaglia* e Paola Mastrantonio

Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica
Istituto Superiore di Sanità, Roma.

Il locus di patogenicità (PaLoc) di *Clostridium difficile* contiene i geni che codificano per la tossina A (*tcdA*) e la tossina B (*tcdB*) e tre geni accessori. Tra questi, si suppone che il gene *tcdC* abbia funzione di regolatore negativo delle tossine e il gene *tcdD* di regolatore positivo. Poco è noto sulla presenza di varianti di questi geni nei ceppi di *C. difficile* da isolati clinici. Allo scopo di identificare ceppi di *C. difficile* varianti per i geni del PaLoc sono stati esaminati 51 ceppi isolati in Italia. I ceppi varianti sono stati identificati tramite:

- l'amplificazione dei geni per la tossina binaria. Questa tossina, ritrovata frequentemente nei ceppi con geni *tcdA* e *tcdB* varianti, può essere utilizzata come marker per l'identificazione rapida di questi ceppi.
- toxinotyping. Si esegue una PCR-RFLP su un frammento del gene *tcdA* e uno del gene *tcdB* che permette di evidenziare la presenza di mutazioni nella loro sequenza nucleotidica.
- una PCR-multiplex per evidenziare la presenza dei geni accessori del PaLoc tramite l'amplificazione di un loro frammento interno.

I risultati ottenuti indicano che il 25% degli isolati di *C. difficile* analizzati presentano geni del PaLoc varianti. Sono stati identificati tre tossinotipi e, tramite sequenziamento, tre alleli del gene *tcdC*. In particolare, uno di questi alleli codifica per una proteina particolarmente ridotta nel numero di aminoacidi. Successivi studi stabiliranno se queste varianti siano in grado di influenzare la produzione e la funzionalità delle tossine di *C. difficile* e quindi la patogenicità di questo microorganismo.

APPLICAZIONE DELLA AFLP A STIPITI DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILLINO RESISTENTI E SENSIBILI DI ORIGINE UMANA E VETERINARIA.

Merletti L.¹, Cuteri V.², Mazzolla R.¹, Marenzoni M.L.³, Valente F.⁴, Tosti N.⁵, Valente C.³

¹Dip. Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche – Università Perugia

²Dip. Scienze Veterinarie – Università Camerino

³Dip. Tecnologie e Biotecnologie delle Produzioni Animali – Università Perugia

⁴Ospedale R. Silvestrini – Perugia

⁵C.N.R. – IRMGPF - Perugia

Staphylococcus aureus è uno dei più importanti e diffusi agenti patogeni di infezione sia in medicina veterinaria che in medicina umana. In seguito all'uso eccessivo di antibiotici si sono differenziati ceppi antibiotico-resistenti. Tra questi, rivestono particolare importanza i batteri meticillino-resistenti (MRSA) generati dall'acquisizione di un gene, *MecA*. Scopo del lavoro è stato quello di evidenziare la presenza di similarità genetiche tra MRSA e stipiti meticillino-sensibili (MSSA) e tra ceppi di origine umana e veterinaria utilizzando l'AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism. Sono stati esaminati 61 stipiti, di cui 32 di origine veterinaria e 29 di origine umana. Il DNA batterico estratto è stato sottoposto a digestione con EcoRI e MseI. Dopo ligazione con adattatori e preamplificazione con primers complementari ai quali è stata aggiunta una base selettiva addizionale è stata eseguita l'amplificazione con primers con due basi selettive, così da ottenere nel complesso 2 combinazioni: Eco+AC/Mse+GT e Eco+AT/Mse+GG. I dati ottenuti sono stati usati per calcolare il coefficiente di similarità di Dice, un'analisi a cluster secondo il metodo UPGMA ed una analisi statistica tramite AMOVA per esaminare la significatività tra i due gruppi (medicina e veterinaria), tra MRSA e MSSA e, nell'ambito dei singoli gruppi, tra sensibili e resistenti. Le elaborazioni sono state eseguite con i pacchetti statistici NTSYS ed Arlequin.

Tutti i ceppi analizzati sono risultati diversi. Il livello medio delle similarità genetiche è risultato più elevato nel caso dei ceppi di veterinaria. La separazione degli isoalti sulla base della loro provenienza risulta abbastanza netta. L'analisi della varianza ha mostrato che tra i batteri delle due provenienze è distribuito il 23,34 % della variabilità. Meno evidente è la separazione tra i ceppi MSSA e MRSA, tra i quali esiste solo il 7,45 % della variabilità totale e quella entro il gruppo di provenienza in cui si ottengono valori piuttosto bassi (8,09 % per i ceppi di medicina e 13,61 % per i ceppi di veterinaria). Sulla base dei risultati si evidenzia una chiara distinzione tra gli isolati, con una certa separazione tra i ceppi di veterinaria e quelli di medicina. Fra gli stipiti di veterinaria vi è un livello di similarità superiore a quelli di medicina. Nel caso della distinzione tra MRSA e MSSA sono stati ottenuti risultati parzialmente contraddittori. Sulla base delle due combinazioni di primer utilizzate, non si evidenzia un livello di similarità che possa far pensare ad una origine comune dei ceppi MRSA di medicina e veterinaria. Infine all'interno della stessa provenienza vi è una certa separazione tra i ceppi MRSA.

ATTIVAZIONE DI PROTEIN TIROSIN CHINASI, PROTEIN CHINASI A E PROTEIN CHINASI C INDOTTA DA PORINE DI *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR TYPHIMURIUM IN MONOCITI UMANI DI LINEA

Marilena Galdiero¹, Marina D'Isanto², Mariateresa Vitiello², Emiliana Finamore², Lucia Peluso², Katia Raieta² e Massimiliano Galdiero¹

¹*Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Microbiologia e Microbiologia Clinica, Seconda Università degli Studi di Napoli;*

²*Dipartimento di Patologia Generale, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Seconda Università degli Studi di Napoli*

In tale lavoro è stato valutato il possibile coinvolgimento delle protein tirosin chinasi (NT-PTKs), della protein chinasi A (PKA) e della protein chinasi C (PKC) nel processo di trasmissione del segnale di attivazione cellulare dopo stimolazione con porine di *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, utilizzando come modello sperimentale cellule U937.

I monociti sono stati trattati con differenti concentrazioni di porine e di lipopolisaccaride (LPS) (0.05-10⁹g/ml) per valutare l'eventuale attivazione di PTK e la fosforilazione di PKA e PKC. Inoltre, sono stati utilizzati specifici inibitori di PTK, PKA e PKC per confermare l'attivazione indotta dalle porine: il tyrphostin 23 (3,4 dihydroxybenzylidenemalononitrile), inibitore del recettore di EGF (epidermal growth factor); H-89 (dihydrochloride) inibitore selettivo di PKA, utilizzato per discriminare tra gli effetti di PKC e PKA; R59949 (diacylglycerol kinase inhibitor II), utilizzato per valutare il ruolo di PKC; calphostin C, inibitore specifico di PKC.

Dopo stimolazione con porine è stato osservato un incremento dose-dipendente dell'attivazione di PTK, PKA e PKC. Nelle cellule trattate con porine, il pretrattamento con gli inibitori induceva un evidente decremento dell'attività di PTK e del pattern di fosforilazione di PKA e PKC.

I nostri risultati evidenziano il ruolo fondamentale di NT-PTK, PKA e PKC nella trasduzione del segnale di attivazione cellulare mediata dalle porine ipotizzando la possibilità che tali proteine siano capaci di innescare differenti vie di trasmissione intracellulare.

ATTIVITA' DI CITOTOSSINA DI *HELICOBACTER PYLORI* SULLA PROLIFERAZIONE CELLULARE IN VITRO.

Pessina A., Bayo M., Cavicchini L., Croera C., Neri M.G., Ticozzi R., Raimondi A.
Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Milano.

La citotossina Vac A (88 Kda) prodotta da *Helicobacter pylori*, considerata un fattore di virulenza importante nella patogenesi di gastrite cronica, ulcera peptica e carcinoma gastrico rimane in parte legata alla superficie batterica e in parte viene secreta nello spazio extracellulare dove si lega a recettori presenti sulle cellule dell'epitelio gastrico. Il suo effetto più studiato riguarda l'attività vacuolizzante correlata con alterazioni della funzione endo-lisosomica e con la formazione di pori nella membrana plasmatica.

La nostra ricerca ha valutato l'effetto "in vitro" di due filtrati semipurificati di brodo colture di *H. pylori* genotipo vacA⁺ e vacA⁻ (verificato mediante PCR) su tre linee cellulari umane di origine epiteliale: cheratinociti trasformati (HaCaT), cellule di carcinoma gastrico (HGC-27), cellule HeLa S3 (riferimento per l'attività vacuolizzante della citotossina Vac A) e la leucemia murina (WEHI-3B). In queste cellule sono state determinate le concentrazioni di filtrato che davano effetto vacuolizzante (test NRU), antiproliferativo e citotossico (test MTT) ed anticlonogenico (soft agar CFU test). Quindi si è indagato l'effetto dei due filtrati batterici sulla sensibilità delle cellule verso un farmaco antineoplastico (Camptotecina) e ad un antibiotico chinolonico (Ciprofloxacina).

I risultati hanno mostrato che l'attività vacuolizzante era espressa solo dal filtrato vacA⁺ verso cui cheratinociti HaCaT e cellule HeLa mostravano identica sensibilità mentre cellule HGC-27 erano significativamente resistenti. Il filtrato del ceppo vacA⁻ di *H. pylori* non produceva vacuolizzazione cellulare ma inibiva la proliferazione e risultava anche citotossico su tutte le linee cellulari (in modo particolare verso cellule WEHI-3B). Concentrazioni di filtrato VacA⁺ in grado di dare vacuolizzazione in cellule HeLa causavano anche inibizione della proliferazione ma non influenzavano la vitalità cellulare. In presenza di entrambi i filtrati vacA⁺ e vacA⁻, alla concentrazione proteica non citotossica, si è osservata una generale diminuzione della tossicità dei farmaci (unica eccezione le cellule HGC-27 con ciprofloxacina dove la tossicità era leggermente aumentata).

Questi dati preliminari suggeriscono che i prodotti di *Helicobacter pylori* oltre ad avere attività antiproliferativa e citotossica possono modulare la sensibilità cellulare (forse a causa della permeabilizzazione della membrana) a farmaci e presumibilmente anche ad altri fattori (es. citochine) che potrebbero avere parte nella genesi delle patologie nelle quali *Helicobacter pylori* sembra coinvolto.

ANTIBIOTICO RESISTENZA DI CEPPI PROBIOTICI ISOLATI DA PRODOTTI ALIMENTARI E FARMACEUTICI

M. Modesto¹, M.R. D'Aimmo¹, L. M. Medina², B. Biavati¹

¹, *Dista Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna, Italy*

², *Department of Food Science and Technology, University of Cordoba, Spain*

La somministrazione di sostanze antibiotiche, è di solito causa di fenomeni di alterazione del delicato equilibrio microbico intestinale.

Quando vengono assunti agenti antimicrobici, la soppressione dei patogeni è spesso accompagnata dalla scomparsa o riduzione di gruppi di batteri benefici come lattobacilli e bifidobatteri, i quali promuovono invece la naturale resistenza dell'ospite contro le infezioni.

La profilassi e le terapie antibiotiche vengono per questo motivo associate all'assunzione contemporanea di batteri esogeni definiti probiotici poiché ritenuti in grado di modificare positivamente e ripristinare il microbiota intestinale.

Particolare cura ed attenzione sono attualmente imposte nella selezione dei ceppi probiotici: un determinante è la loro "biosicurezza", l'incapacità cioè di determinare infezioni intestinali ed extraintestinali nell'ospite, l'impossibilità di trasferire ad altri batteri la loro intrinseca resistenza agli agenti antimicrobici.

Abbiamo studiato i profili di antibiotico resistenza e suscettibilità di alcuni microrganismi probiotici al duplice scopo di contribuire alla comprensione di quei meccanismi che alterano la normale microflora intestinale quando agenti antimicrobici vengono assunti, ed aumentare le proprietà di selezione di media di coltura utilizzabili per il loro isolamento in campioni di microflora mista.

Abbiamo isolato da prodotti alimentari e farmaceutici disponibili in commercio 34 ceppi dichiarati come probiotici, appartenenti ai generi *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (22 e 12 ceppi rispettivamente), e 22 ceppi di colture starters.

Tutti i microrganismi sono stati confrontati mediante elettroforesi delle proteine solubili.

La Minima Concentrazione Inibente (MIC) di 24 comuni sostanze antimicrobiche è stata valutata attraverso il metodo delle microdiluzioni in brodo.

Tutti i ceppi isolati mostrano sensibilità per ampicillina, bacitracina, clindamicina, dicloxacillina, eritromicina, lincomicina, novobiocina, penicillina G, rifampicina, vancomicina con MIC₉₀ £5mg/ml.

Cloramfenicolo, cefalotina e tetraciclina agiscono con MIC₉₀ £ 50mg/ml, mentre per cicloserina, streptomina, kanamicina, metronidazolo, gentamicina, acido nalidixico, polimixina B, neomicina, paromomicina, aztreonam, spectinomina e streptomina, la MIC₉₀ è ≥ 50mg/ml.

ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DELL'OLIO ESSENZIALE DI *MELALEUCA ALTERNIFOLIA* E DEI SUOI PRINCIPALI COMPONENTI NEI CONFRONTI DI BATTERI DI ORIGINE CLINICA ED ALIMENTARE.

Ferrini A.M.^a, Mannoni V.^a, Salvatore G.^b, Aureli P.^a

Ceddia T.^c, Pontieri E.^c, Oliva B.^c

a) Istituto Superiore di Sanità (lab. Alimenti), V.le Regina Elena, 299 - Roma

b) Istituto Superiore di Sanità (lab. Tossicologia comparata ed Ecotossicologia), V.le Regina Elena, 299 - Roma

c) Università degli Studi de L'Aquila (Dip. di Medicina Sperimentale), Coppito II, L'Aquila

Si sono indagate le proprietà antibatteriche dell'olio essenziale di *Melaleuca alternifolia* di composizione accertata (α -tuienone 0.9%; α -pinene 2.7%; α -terpinene 10.5%; 1,8-cineolo 3.0%; γ -terpinene 23.0%; terpinolene 3.8%; terpinolene-4-olo 48.9%; α -terpineolo 2.7%) e dei componenti: terpinene-4-olo, 1,8-cineolo, terpinolene, α -terpinene e γ -terpinene. L'aggiunta di Tween 80 allo 0.5% ha permesso la solubilità dell'olio e dei suoi costituenti che sono stati poi inclusi, con diluizioni seriali per raddoppio (dal 4% allo 0.03%), direttamente in Mueller Hinton agar. Le valutazioni sono state effettuate secondo la procedura raccomandata dall'NCCLS (the National Committee for Clinical Laboratory Standards) per gli antibiotici. Il valore delle singole MIC (Minimum Inhibitory Concentration) è stato determinato per batteri Gram-positivi e Gram-negativi di recente isolamento clinico ed alimentare: *Staphylococcus aureus* (48 meticillino-sensibili e 26 resistenti; 7 vancomicina resistenti intermedi); 3 *Staphylococcus epidermidis*; 1 *Staphylococcus saprophyticus*; 2 *Enterococcus agglomerans*; 6 *Enterococcus faecalis*; 6 *Enterococcus faecium*; 10 *Listeria monocytogenes*; 6 *Burkholderia cepacia*; 3 *Citrobacter freundii*; 7 *Haemophilus influenzae*; 10 *Klebsiella pneumoniae*; 6 *Moraxella* spp.; 4 *Serratia marcescens*; 5 *Xanthomonas maltophilia*; 10 *Salmonella* spp., per un totale di 160 ceppi. I risultati mostrano una buona sensibilità dei batteri per gli analiti testati, specialmente per *Melaleuca alternifolia* e terpinene-4-olo. In alcuni casi, la sensibilità è risultata maggiore di quella osservata nei confronti degli antibiotici utilizzati come riferimento (ampicillina, eritromicina, cloramfenicolo, gentamicina, kanamicina e vancomicina), rappresentanti dei chemioantibiotici tra i più usati in terapia umana e veterinaria.

L'impiego di una procedura analitica standardizzata ha garantito la riproducibilità dei dati; ciò è condizione essenziale per la confrontabilità dei risultati ottenuti in laboratori diversi, particolarmente per quanto riguarda i saggi relativi all'attività antimicrobica.

ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DI POLIURETANI TRATTATI CON ANTIBIOTICI: NUOVE PROSPETTIVE DI PREVENZIONE DELLE INFEZIONI ASSOCIATE AI CATETERI VASCOLARI.

Francolini I¹, Piozzi A.¹, Marconi W.¹, Di Rosa R.², Donelli G.³

¹Dipartimento di Chimica e ²Dipartimento di Medicina Clinica, Università "La Sapienza", Roma; ³Laoratorio di Ultrastrutture, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

I cateteri vascolari rappresentano strumenti essenziali per un'appropriate gestione dei pazienti ospedalizzati poiché consentono sia la somministrazione di farmaci che il prelievo di campioni di sangue. Tuttavia l'insorgenza di infezioni rappresenta una seria complicanza associata al loro impiego. Infatti, quando un catetere viene impiantato, i microrganismi presenti sull'epidermide del paziente possono, attraverso il sito d'entrata del catetere, penetrare in profondità nella cute, aderire alle superfici del dispositivo, colonizzarle e talvolta propagarsi ad altri distretti corporei a seguito del loro rilascio nel sangue. La nostra ricerca è focalizzata sulla messa a punto di polimeri antibatterici in grado di prevenire la colonizzazione microbica a seguito di adsorbimento chimico di antibiotici sulla loro superficie. Gli esperimenti sono stati condotti su poliuretani, polimeri tra i più impiegati nella fabbricazione dei cateteri. Gli antibiotici amoxicillina e rifampicina sono stati selezionati per la loro azione antibatterica nei confronti dei gram-positivi e per la capacità di interagire con i poliuretani, dovuta alla presenza nella loro molecola di adatti gruppi funzionali. La quantità di antibiotico che è stata adsorbita ai polimeri è risultata di circa 1 mg/cm². Il rilascio degli antibiotici dai polimeri è stato studiato effettuando lavaggi in soluzione fisiologica, mentre la capacità antibatterica *in vitro* dei polimeri è stata valutata mediante test di Kirby Bauer modificato, impiegando *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984) come microrganismo sensibile. Per i polimeri trattati con amoxicillina è stata osservata un'inibizione della crescita batterica della durata di poche ore; nel caso del trattamento con rifampicina, si è invece osservata un'inibizione di durata superiore a 6 mesi. Per verificare l'influenza delle proteine sieriche sull'azione antimicrobica, i polimeri trattati sono stati inoltre incubati a 37°C e per tempi crescenti in siero umano, confrontandone il comportamento con quello degli stessi polimeri incubati in soluzione fisiologica. I risultati finora ottenuti indicano come gli esperimenti effettuati e quelli tuttora in corso possano aprire nuove ed interessanti prospettive per la realizzazione di cateteri capaci di ostacolare la colonizzazione microbica di superficie.

ATTIVITÀ ANTIFUNGINA DI LAVANDULA ANGUSTIFOLIA VERSO C.ALBICANS

D'Auria FD, Tecca M, Mazzanti G, Battinelli L, Strippoli V

Istituto di Microbiologia, Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica e Dipartimento di Farmacologia delle Sostanze Naturali e Fisiologia Generale -Università di Roma "La Sapienza"

L'olio essenziale di *Lavandula angustifolia* (Lavanda) è largamente impiegato in aromaterapia come rilassante e secondo alcuni autori presenta una spiccata azione carminativa e sedativa per inalazione. Alcuni autori hanno dimostrato la sua capacità antiossidante ma sono pochi gli studi che hanno evidenziato un'attività antimicrobica. Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare l'azione antifungina esercitata dalla Lavanda verso ceppi di *Candida albicans* e in particolare abbiamo valutato l'azione di questo olio essenziale verso alcuni fattori di virulenza. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la Lavanda presenta una spiccata azione antifungina verso ceppi di *C.albicans* di fresco isolamento da materiale clinico e che tale azione si esplica principalmente verso il tubo germinativo (fattore di virulenza in questo fungo dimorfo) ad una concentrazione dello 0.09% rispetto alla fase lievito (3.5%), inoltre a concentrazioni inferiori si osserva una parziale riduzione della lunghezza delle ife rispetto al controllo non trattato. Studi preliminari hanno dimostrato che la lavandula alla concentrazione del 2% mostra un'azione citocida in 15min verso *C.albicans*; tale attività dipende verosimilmente da un danno sulla membrana cellulare con una alterazione della permeabilità come dimostrato nei nostri studi con propidium iodide un fluorocromo incapace di penetrare cellule integre. La Lavanda alla concentrazione dell'1% mostra inoltre una spiccata capacità inibente la produzione di fosfolipasi di *C.albicans* in 5min, tale attività si evidenzia anche a concentrazioni dello 0.5% in un tempo di 30min. Questo risultato è di particolare interesse poiché la fosfolipasi insieme al tubo germinativo partecipa alla diffusione delle cellule fungine nei tessuti infettati. Ulteriori prove sperimentali sono state allestite per stabilire l'azione antifungina esercitata da alcuni tra i principali componenti della Lavanda (linalolo e linalilacetato). I risultati ottenuti dimostrano che l'attività antifungina della Lavanda è data dall'azione additivo/sinergica dei due componenti in esame, infatti il linalolo è più efficace verso la fase lievito di *C.albicans* e il linalilacetato verso la fase miceliale. In conclusione la Lavanda ha dimostrato una efficace azione antifungina diretta verso le due fasi di *C.albicans* e verso alcuni fattori di virulenza. Altri studi sono necessari per un ulteriore approfondimento dei dati ottenuti.

ATTIVITÀ ANTI-HIV DI NUOVI DERIVATI ISOTIAZOLICI

A. Garozzo, M.G. Crispino, G. Tempera, A. Castro - Dipartimento di Scienze Microbiologiche - Università di Catania;
C.C.C. Cutrì, M.A. Siracusa, F. Guerrera, - Dipartimento di Scienze Farmaceutiche - Università di Catania.

In precedenti ricerche abbiamo dimostrato l'attività antipicornavirus di composti a struttura isotiazolica. L'esigenza di ottenere farmaci anti-HIV, strutturalmente differenti dagli analoghi nucleosidici ci ha indotto a valutare l'attività antivirale di tali composti contro HIV-1(III_B) e HIV-2(ROD) su cellule MT-4. Dal nostro studio è emerso che il 3-mercapto-5-fenil-4-isotiazolcarbonitrile (**A**), attivo nei confronti del virus polio1 ed ECHO 9, mostrava un'attività antivirale sia nei confronti di HIV-1(III_B) che di HIV-2(ROD) con una IC₅₀ rispettivamente di 7,8 e 9,7 µg/ml. Sulla base di questi risultati sono stati sintetizzati nuovi derivati 3-sostituiti: tra questi il 5,5'-fenil-4,4'-ciano-3,3'-diisotiazolo (composto **B**), così come il suo capostipite, ha mostrato attività anti-picornavirus ed anti-HIV, mentre era inattivo nei confronti degli altri virus testati e l'S-[3-(4 ciano-5-fenil) isotiazolil] etil tiocarbonato (composto **C**) era attivo non solo nei confronti dei virus HIV, Polio ed ECHO ma anche nei confronti dei virus Coxsackie B1, EMC e Morbillo. Dai risultati ottenuti possiamo supporre che il componente attivo sia il 3-mercapto-5-fenil-4-isotiazolcarbonitrile od un suo sale, in quanto ipotizziamo che *in vitro* il ponte disolfuro del composto B venga ridotto ed il legame tioestereo del composto C venga idrolizzato per ottenere la molecola responsabile dell'attività antivirale.

ATTIVITÀ ANTIMICOTICA DELL'OLIO ESSENZIALE DI *MALALEUCA ALTERNIFOLIA* E DEI SUOI PRINCIPALI COMPONENTI

Oliva B.¹, Ceddia T.¹, Piccirilli E.¹, Pontieri E.¹,

Aureli P.², Mannoni V.², Salvatore G.³, Ferrini A.M.²

Dipartimento di medicina Sperimentale - Sez. Microbiologia, Università degli Studi de L'Aquila (1)

Istituto Superiore di Sanità - Lab. di Microbiologia degli Alimenti (2) e Lab. di Tossicologia comparata ed Ecotossicologia (3) - Viale Regina Elena, 299. Roma

È stato condotto uno studio sulle proprietà antimicotiche dell'olio essenziale della *Melaleuca alternifolia* di composizione accertata (α -tuienone 0.9%; α -pinene 2.7%; α -terpinene 10.5%; 1,8-cineolo 3.0%; γ -terpinene 23.0%; terpinolene 3.8%; terpinolen-4-olo 48.9%; α -terpineolo 2.7%) e dei suoi principali componenti (terpinen 4-olo, cineolo, terpinolene, α -terpinene e γ -terpinene) in comparazione a noti antimicotici usati in terapia umana. Dopo aggiunta di Tween 80 al 0.5 % e diluizioni seriali per raddoppio degli oli essenziali (dal 4% allo 0.03%), è stato determinato il valore delle M.I.C. (Minimum Inhibitory Concentration) mediante il metodo della replica su Mueller-Hinton agar nei confronti di 13 ceppi di *Candida lipolitica*, 55 di *Candida parapsilosis*, 2 di *Candida glabrata*, 2 di *Candida lusitanae*, 1 di *Candida inconspicua*, 1 di *Candida guilliermondii*, 2 di *Candida albicans*, 25 di *Blastoschizomyces capitatus*. Tranne i ceppi ATCC tutti erano di isolamento clinico. I risultati ottenuti mostrano una buona sensibilità di tutti i miceti studiati nei confronti degli oli essenziali di *Melaleuca alternifolia* e specialmente del terpinen 4-olo; quest'ultimo che entra nella composizione di quello della *Melaleuca* per non più del 50% mostra la migliore attività con valori di M.I.C. sempre inferiori ad 1 % anche nei confronti di miceti che mostrano resistenza o sensibilità intermedia agli antimicotici usati in terapia umana.

ATTIVITÀ ANTISTREPTOCOCCICA DI *HELICHRYSUM ITALICUM* ED INTERFERENZA CON LE PROPRIETÀ CARIOGENE

Nostro A., Cannatelli M.A., Crisafi G., Procopio F., Musolino A.D., Alonzo V.

Dipartimento Farmaco-Biologico, Settore Microbiologia, Facoltà di Farmacia. Villaggio Annunziata, 98168 Messina.

Nell'ambito dei nostri studi sull'attività antimicrobica di estratti naturali, l'attenzione si è focalizzata su *Helichrysum italicum*, una pianta ricca in flavonoidi e terpeni che ha mostrato in precedenti studi una buona attività inibente su ceppi di *Staphylococcus aureus*. Lo scopo di questo studio è stato quello di verificare l'attività antimicrobica e gli effetti dell'estratto etanologico di *H. italicum* su Streptococchi del cavo orale per un potenziale utilizzo come agente antimicrobico in formulazioni per l'igiene orale. In una prima fase del lavoro è stata valutata l'attività antimicrobica dell'estratto su ceppi di *Streptococcus mutans* ATCC 35668, *sanguis* ATCC 10556 e *salivarius* ATCC 13419. Successivamente è stata rilevata l'interferenza dell'estratto sulle proprietà cariogene quali aderenza a superfici lisce, idrofobicità di superficie, aggregazione in presenza di destrano e produzione acida.

I risultati mostrano che *H. italicum* possiede attività antimicrobica nei confronti degli Streptococchi saggiati con valori di MIC pari a 31.25-62.5 µg/ml. Concentrazioni subinibenti dell'estratto (1/2, 1/4 e 1/8 MIC) non influenzano la crescita di *Streptococcus mutans* ma riducono significativamente la capacità adesiva, l'idrofobicità di superficie e interferiscono con l'aggregazione cellulare. L'esame microscopico dei campioni trattati ha messo in evidenza una riduzione degli aggregati cellulari tipici dei controlli. *H. italicum* inibisce, inoltre, il grado di produzione acida.

ATTIVITÀ ANTIVIRALE DI SOSTANZE DI ORIGINE NATURALE

A. Garozzo, M.G. Crispino, S. Crispino, A. Stivala, G. Tempera, A. Castro - Dipartimento di Scienze Microbiologiche - Università di Catania;

F. Bonina, N.A. Santagati - Dipartimento di Scienze Farmaceutiche - Università di Catania..

Le numerose segnalazioni in letteratura riguardanti l'attività antibatterica, antifungina e antivirale di alcuni composti ottenuti per estrazione dalle piante hanno fornito spunti interessanti per approfondire lo studio sull'attività antivirale di composti ottenuti per estrazione di semi di diverse specie di agrumi, in particolare abbiamo studiato una serie di metaboliti secondari terpenoidici, presenti principalmente nelle piante appartenenti all'ordine delle Rutales (**limonoidi**). In questo studio è stata saggiata l'attività antivirale *in vitro* nei confronti dei virus Herpes simplex tipo 1 e 2, Polio1, ECHO 9, Morbillo, Coxsackie B1 e B3, Adeno 2 e 5 di composti ottenuti per estrazione da semi e succo di mandarancio, limone, mandarino, arancio e bergamotto. Dai risultati dello *screening* è emerso che l'estrazione dei limonoidi dai semi o dal succo con l'utilizzo di vari solventi durante gli *steps* estrattivi ha determinato un diverso comportamento dell'attività antivirale nei confronti dei virus analizzati.

Gli estratti di mandarino, di arancio e di bergamotto ottenuti per estrazione sia in esano che in diclorometano sono risultati privi di attività antivirale. Anche il composto ottenuto per estrazione da succo di limone era inattivo contro tutti i virus saggiati; i campioni ottenuti per estrazione dei semi di limone hanno presentato differente attività in base al solvente utilizzato: in particolare il campione ottenuto per estrazione con esano presentava un'attività antipolio con un indice di selettività pari a 5, mentre il campione ottenuto per estrazione con diclorometano non ha mostrato attività.

Poiché il campione attivo è stato ottenuto dall'estrazione dei semi con esano, si pensa sia costituito prevalentemente da composti lipidici (la cui identificazione è tuttora in corso); ciò fa presupporre che l'attività antivirale potrebbe essere dovuta a vari composti naturali o all'azione sinergica di essi.

I campioni ottenuti per estrazione dai semi di mandarancio mostravano attività contro i virus del morbillo, HSV 1 e HSV 2, indipendentemente dal tipo di solvente utilizzato per l'estrazione. Per acquisire dati sul meccanismo d'azione di questi composti è stato testato l'effetto neutralizzante degli estratti nei confronti di HSV1 e HSV2. Gli esperimenti di virucidia hanno evidenziato un'attività virucida dose e tempo dipendente nei confronti dei virus HSV1 ed HSV2.

ATTIVITÀ IMMUNOMODULANTE DELLA FOSFOMICINA TROMETAMOLO SUI MECCANISMI DI DIFESA ASPECIFICA DEI SOGGETTI SANI E PAZIENTI IMMUNOCOMPROMESSI

V. Tullio, A.M., Cuffini, N.Mandras, G.Banche, J.Roana e N.A. Carlone

Dipartimento di Sanità Pubblica e di Microbiologia-Università di Torino

Il successo nel trattamento delle infezioni microbiche è correlato al sinergismo tra il sistema immunitario del paziente e i farmaci antibatterici impiegati nell'eradicare l'infezione. Tra i pazienti immunocompromessi, quelli con insufficienza renale risultano particolarmente sensibili alle infezioni ad elevata morbilità e mortalità, la cui incidenza è correlabile ad un forte indebolimento della risposta fagocitaria, dovuto per lo più ad alterazioni funzionali a carico di diverse attività o tappe metaboliche. Ne consegue che, in questi pazienti, la terapia ottimale dovrebbe prevedere l'utilizzo di farmaci in grado di stimolare o, almeno, di non inibire le difese immunitarie dell'ospite.

In questo studio si sono valutati gli effetti *in vitro* della fosfomicina trometamolo, a concentrazioni subinibenti, sulle funzioni primarie dei fagociti PMN provenienti sia da soggetti sani sia da pazienti immunocompromessi, in particolare emodializzati e portatori di trapianto renale, nei confronti di un ceppo di *Escherichia coli*, uno dei più importanti batteri responsabili di infezioni non complicate delle vie urinarie. La scelta di questo farmaco è stata determinata da alcune sue importanti proprietà farmacologiche: ampio spettro di attività antibatterica su batteri responsabili di infezioni urinarie, biodisponibilità orale, scarso legame alle sieroproteine, lunga emivita, elevate e persistenti concentrazioni urinarie, ridotta insorgenza delle resistenze.

I risultati evidenziano che la fosfomicina trometamolo, a concentrazioni subinibenti, esercita un'interazione positiva con le difese aspecifiche dell'ospite che si traduce in un aumento dell'attività fagocitaria iniziale, ma, soprattutto in uno spiccato potenziamento dell'attività microbica sia nel soggetto sano sia in quello immunocompromesso, riportando in quest'ultimo la funzionalità dei PMN a valori pressoché normali. L'attività immunomodulante della fosfomicina trometamolo è probabilmente da imputare ad una cooperazione tra l'attività dei fagociti con quella dell'antibiotico esercitata direttamente sul batterio, che "indebolito" viene più facilmente aggredito dai sistemi litici dei PMN.

ATTIVITÀ *IN VITRO* DI SYNERCID IN COMBINAZIONE CON TEICOPLANINA NEI CONFRONTI DI STAFILOCOCCI MULTIRESISTENTI

A. Marchese, Gualco L. e G.C. Schito*

Sezione di Microbiologia C.A. Romanzi, Università degli Studi di Genova

Gli stafilococchi, e in particolare *Staphylococcus aureus*, rappresentano i principali germi Gram-positivi responsabili di gravi infezioni nosocomiali. Il trattamento di tali affezioni è stato complicato dalla diffusione della meticillino-resistenza che si accompagna a refrattarietà a numerose altre classi di farmaci. In anni più recenti l'emergenza di ceppi con ridotta sensibilità ai glicopeptidi ha ulteriormente aggravato la situazione. Synercid, associazione di due streptogramine, si è rivelato attivo *in vitro* nei confronti di tali microorganismi ed è pertanto indicato nel trattamento di quadri clinici particolarmente impegnativi dove il rischio di fallimento di farmaci impiegati in monoterapia appare elevato.

In questo studio è stata valutata l'attività di Synercid combinato con teicoplanina nei confronti di stafilococchi multiresistenti, inclusi stipiti con ridotta sensibilità ai glicopeptidi. Sono stati saggiati 18 ceppi di cui: 10 *S.aureus* meticillino-resistente (MR) che presentavano refrattarietà ad almeno altre due classi di antibiotici tra cui fluorochinoloni, macrolidi e aminoglicosidi, 1 *S.aureus* MS resistente ai macrolidi, 3 *S.aureus* MR etero-resistenti alla vancomicina, 1 *S.aureus* intermedio alla vancomicina (VISA) e 3 *S.haemolyticus* MR intermedi alla teicoplanina.

L'interazione tra le due molecole è stata valutata con la metodica del time-kill (NCCLS, 1998).

L'effetto di Synercid combinato con teicoplanina è risultato sinergico nei confronti del 50% dei ceppi saggiati. In particolare, nei confronti di *S.aureus* MR in 7 casi su 14 si è registrato sinergismo, indipendentemente da altri caratteri di resistenza. Sinergismo si è anche verificato per il ceppo VISA studiato e per 2 isolati etero-resistenti alla vancomicina sui 3 saggiati. Synercid combinato con teicoplanina ha dimostrato effetto sinergico nei confronti di un ceppo di *S.haemolyticus* intermedio alla teicoplanina.

Globalmente, l'effetto dell'associazione di Synercid con teicoplanina può quindi essere considerato favorevolmente poiché questa combinazione dà luogo ad addittività o sinergismo e in nessun caso si è verificato antagonismo tra le due molecole. L'impiego associato dei due principi consente inoltre di potenziare il lento effetto battericida dei glicopeptidi producendo più rapida eradicazione di questi patogeni problematici.

ATTIVITÀ INIBENTE DI UNA BATTERIOCINA-LIKE, PRODotta DA *E. DURANS*, SU *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, *BURKHOLDERIA CEPACIA* E *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA*

A. Marino, L. Lombardo, C. Fiorentino, M. Mezzatesta*, G. Bisignano, V. Alonzo

Dipartimento Farmaco-Biologico, Università degli Studi di Messina. Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche, Università degli Studi di Catania*.

Introduzione. Le batteriocine sono antibiotici proteici ad attività battericida intraspecie e non. Gli enterococchi sono ceppi produttori. In studi precedenti, è stato isolato dall'ambiente, un ceppo selvaggio di *Enterococcus durans* che produce un esoprodotto (batteriocina-like) con caratteristiche simili a quelle delle batteriocine: natura proteica e sensibilità agli enzimi proteolitici; termostabilità ed attività ottimale a pH 6. Ampio spettro d'azione. **Obiettivo** di questa ricerca è stato quello di studiare l'azione inibente di questo esoprodotto su isolati clinici di *Pseudomonas aeruginosa*, di *Burkholderia cepacia* e di *Stenotrophomonas maltophilia*. **Materiali e metodi.** La MIC e la MBC dell'esoprodotto ultrafiltrato (cut-off 3 kDa) sono state valutate con il metodo delle micropiastre. Sui ceppi sensibili dotati di adesività è stata valutata l'interferenza sul potere adesivo. **Risultati.** L'azione inibente di questo esoprodotto è stata rilevata su tutte le specie saggiate. Per tutti i ceppi clinici sono stati rilevati valori di M.I.C. compresi fra 1:4 ed 1:8; in particolare è stato riscontrato un valore di 1:4 per *B. cepacia* LG 27-4, *P. aeruginosa* NF11 e *S. maltophilia* NF14 resistenti a varie classi di antibiotici ed un valore di 1:8 per *P. aeruginosa* ATCC 9027. I risultati della M.B.C. hanno mostrato che questo prodotto ad una concentrazione pari a 2 M.I.C. è battericida su tutti i ceppi eccetto *S. maltophilia* NF14 per la quale è necessaria l'azione del prodotto non diluito. Dosi subinibenti hanno inoltre ridotto l'adesività di tutti i ceppi, indipendentemente dal loro grado iniziale di adesione alle superfici in polistirene. **Conclusioni.** I risultati ottenuti dimostrano l'azione battericida di questo prodotto e la sua influenza sulla riduzione del grado di adesività dei ceppi saggiati. Studi sono attualmente in corso per ottenere l'identificazione e il meccanismo d'azione della molecola nell'ottica dello sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

ATTIVITA' ANTIMICOTICA IN VITRO ED IN VIVO DELL'OLIO ESSENZIALE DI *MELALEUCA ALTERNIFOLIA* (TEA TREE OIL) SU LIEVITI PATOGENI UMANI SENSIBILI E RESISTENTI AGLI AZOLICI.

F. Mondello, F. De Bernardis, A. Girolamo, G. Salvatore*, A. Cassone.

Laboratorio di Bacteriologia e Micologia Medica, * Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il "tea tree oil" (TTO), un olio essenziale ottenuto dalla distillazione a vapore delle foglie di *Melaleuca alternifolia*, una pianta originaria dell'Australia, è stato proposto all'interno di una strategia "naturale" alternativa per il trattamento delle micosi, in particolare della candidasi vulvovaginale, infezione spesso ricorrente e refrattaria alla terapia antimicotica. Tuttavia, prove dimostrative dell'efficacia in vivo di questa strategia non sono state ancora ottenute e chiaramente riportate in studi clinici e pre-clinici controllati. In questa linea di pensiero, abbiamo valutato l'attività del TTO in 115 ceppi clinici e di laboratorio di *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. sensibili e resistenti al fluconazolo (FCZ) e/o all'itraconazolo (ITR). Inoltre, la stessa preparazione di TTO è stata saggiata in vivo in un modello di vaginite sperimentale con ratte ovariectomizzate e mantenute sotto estrogeni (vedi De Bernardis F. *et al.* Infect. Immun. 1997, 65:3399-3405) con ceppi di *Candida albicans* sensibili o resistenti a FCZ e/o ITR. TTO è risultato efficace in vitro per tutti i ceppi saggiati con MIC nel range da 0.03% (v/v) per *C. neoformans* a 0.25% (v/v) per *C. albicans* e altre specie di *Candida*. In particolare, i quattordici ceppi di *C. albicans* resistenti a FCZ e/o ITR hanno mostrato MIC₅₀ e MIC₉₀ del TTO di 0.25% e 0.5% (v/v) rispettivamente, del tutto sovrapponibili a quelle dei ceppi sensibili.

TTO è risultato molto efficace nell'eliminazione del fungo dalla vagina delle ratte infettate con un ceppo altamente vaginopatico e trattate per i primi tre giorni dell'infezione con una dose singola giornaliera di TTO. Specificamente, tre dosi post-challenge di TTO al 5% (v/v) hanno risolto l'infezione con *C. albicans* con la stessa efficacia del FCZ (nel ceppo ad esso sensibile) e efficacemente anche nel ceppo resistente a FCZ.

Questi dati confermano gli estesi effetti antifungini in vitro del TTO, ma in particolare dimostrano l'elevata attività di questo olio essenziale in un modello d'infezione sperimentale molto stringente e predittivo della terapia della vaginite da *Candida* nelle donne.

AUMENTATA AZIONE MICROBICIDA DEL TIOCONAZOLO VERSO MICRORGANISMI RESISTENTI PER AZIONE DI UN ANTIOSSIDANTE FENOLICO (BUTILATO IDROSSIANISOLO)

Giovanna Simonetti, Nicola Simonetti, Adelaide Villa

Istituto di Microbiologia - Facoltà di Farmacia
Università di Roma "La Sapienza"

Summary

Tioconazole killed in fungicidal activity test in less than 3 min, in citrate buffer 0,02 M pH 5,6 10^4 resistant *Candida albicans* with the addition of butylated hydroxyanisole, a phenolic antioxidant, at subinhibitory concentrations. The bactericidal activity had effect in short time also against resistant *Escherichia coli*.

Moreover in culture inhibition test butylated hydroxyanisole increased the tioconazole activity in RPMI 1640 medium 18 times against 10 strains of resistant *C. albicans* and enlarged 23 times, in according with NCCLS method for bacteria, the activity against 10 resistant *Escherichia coli* strains.

Furthermore butylated hydroxyanisole at subinhibitory concentrations promoted the reduction of *C. albicans* virulence because reduced 180 times the hyphal cells of tioconazole and decreased the hydrophobicity of *C. albicans* cells.

The tioconazole activity could be related to the cellular permeability because butylated hydroxyanisole increased the leakage of cellular enzymes and the methylene blue uptake.

AUTOANTICORPI E CELIACHIA

Sciacca A., Spina M*, Grassi P., Russo R., Grasso E., Lombardo A., Trapanotto G., Mazzurco A.

Laboratorio analisi Azienda Policlinico Università Catania

DH Gastroenterologia Pediatrica* Azienda Policlinico Università Catania

Il sistema immunitario riveste un ruolo importante nel dare inizio e mantenere i meccanismi di tolleranza verso antigeni di provenienza intestinale. Nella celiachia, un'enteropatia autoimmune che interessa la porzione prossimale dell'intestino, il principale autoantigene è rappresentato dalla transglutaminasi, enzima intracellulare ubiquitario che catalizza il cross-linking irreversibile di alcune proteine. Il dosaggio degli anticorpi antiendomio (EMA) e anti-transglutaminasi (tTG), supportati sempre dalla biopsia intestinale, sono indispensabili per la diagnosi di malattia celiaca. Presso il DH di Gastroenterologia Pediatrica del Policlinico vengono seguiti circa 900 soggetti celiaci a dieta priva di glutine, questi pazienti oltre i normali esami chimico-clinici vengono monitorati con il dosaggio di autoanticorpi correlati a patologie autoimmuni.

Retrospectivamente sono state controllate 500 cartelle cliniche di pazienti celiaci in cui sono stati dosati in IFA (Euroimmun GmbH Lubeck) anticorpi anti-nucleo (ANA), anti-DNA-nativo, antimitocondrio (AMA), antimuscolo liscio (ASMA), anticellule parietali gastriche (APCA), anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA), antireoglobulina (AAT) e antimicrosomi (AAM). Gli anticorpi Anticardiolipina IgG, IgM, IgA e gli ENA sono stati determinati con metodica ELISA. Tutti i pazienti con dieta priva di glutine, nei controlli successivi alla prima diagnosi, presentano riduzione o completa negativizzazione degli EMA e tTG. In nessuno sono stati riscontrati anticorpi anti-cardiolipina e ANCA. ANA sono stati evidenziati in 10 celiaci: 5 con basso titolo (1/40), 5 con titolo >1/160, condizione quest'ultima sempre associata ad epatite autoimmune. ASMA a titoli non superiore a 1/40 sono stati riscontrati nel 47% dei pazienti, mentre AMA e APCA sempre a basso titolo nel 22% dei casi. Pur essendo alta la % di pazienti con positività per ASMA, AMA e APCA non sono state riscontrate manifestazioni cliniche di malattie autoimmuni. Nei pazienti diabetici con celiachia gli anti-insulina pancreatici ICA sono risultati sempre negativi, mentre il 10% dei celiaci presentano una tiroidite con titoli significativi di AAT e AAM.

Il monitoraggio degli autoanticorpi nei pazienti con celiachia accertata e a dieta priva di glutine ci permette pertanto di evidenziare i pazienti a rischio di malattie autoimmuni. Una corretta dieta aglutinata probabilmente è in grado di ridurre significativamente il rischio di tali patologie.

Individuare pazienti con malattia celiaca silente attraverso il saggio degli EMA e tTG è fondamentale per ridurre la comparsa di malattie autoimmuni.

BASI MOLECOLARI DELL'ASSOCIAZIONE DELL'ERM(TR) CON ALTRI GENI DELLA RESISTENZA AI MACROLIDI E CON TET(O) IN S.PYOGENES.

Cascone C¹, Santagati M¹, Fichera C¹, Mezzatesta ML¹, Pozzi G² e Stefania Stefani¹

¹Università di Catania, ²Università di Siena.

In *S.pyogenes*, la resistenza ai macrolidi è associata a due principali meccanismi biochimici: metilazione del target e l'efflusso dell'antibiotico. Il primo è ascrivibile a due determinanti di resistenza *erm*(B), e più recentemente *erm*(TR) appartenente alla classe *erm*(A) (fenotipo MLS_B), il secondo associato alla presenza dei geni della classe *mef*(A) (fenotipo M). Da un precedente studio condotto su 103 ceppi di *S. pyogenes* resistenti all'eritromicina è stato selezionato il campione di 13 ceppi oggetto di questo studio. Esso comprende: 11 ceppi resistenti alla tetraciclina e con fenotipo MLS_B; 9 presentano il gene *erm*(TR) e *tet*(O); 2 *erm*(TR) associato ai geni *erm*(B) e *tet*(O); e solo 2 tetracicline-sensibili e fenotipo MLS_B veicolano *erm*(TR) in associazione a *mef*(A). In questo lavoro è stata studiata l'associazione e l'espressione di più determinanti di resistenza, valutando (i) il background genetico mediante PFGE; (ii) la localizzazione cromosomica di ciascun gene di resistenza mediante Southern Blot; (iii) la mobilità mediante la coniugazione ed infine è stata studiata l'espressione dei singoli determinanti mediante RT-PCR. L'analisi dei profili di PFGE ha evidenziato una stretta correlazione genetica nei ceppi che presentavano associati i geni *erm*(TR)-*erm*(B)-*tet*(O) ed in quelli con *erm*(TR)-*tet*(O), costituendo un gruppo omogeneo. Inoltre, l'ibridazione utilizzando sonde specifiche per ciascun gene di resistenza ha mostrato che *erm*(TR) e *tet*(O) sono localizzati sempre su uno stesso frammento *Apa*I. Solo in un caso è stato possibile trasferire il gene *erm*(TR) ma non *tet*(O) da un ceppo di *S.pyogenes* ad un ricevente di *S.pyogenes* (*Erm*^S, *Km*^R, *Sm*^R); infine, in nessun caso si è verificato il trasferimento di *erm*(TR) dai ceppi con *erm*(B)-*erm*(TR)-*tet*(O) e con *mef*(A)-*erm*(TR). Lo studio mediante RT-PCR ha dimostrato che tutti i ceppi esprimevano i rispettivi determinanti di resistenza.

In conclusione, dai nostri risultati emerge i) una stretta correlazione genica nell'ambito dei ceppi che possiedono i geni *erm*, diversamente da quelli con *mef*(A), ii) il gene *erm*(TR) non sempre è coniugativo ed infine iii) ciascun ceppo esprime sempre i rispettivi geni di resistenza.

BATTERI E VIRUS IN TESSUTI DI FETO E PLACENTA PROVENIENTI DA ABORTI SPONTANEI

AM. Penta, AC. Longhi, AM. P. Conte, BA. Degener, AV. Pietropaolo, AD. Fioriti, AF. Chiarini, CB. Villaccio, CA. Lukic, AL. Seganti

^ADip. Scienze di Sanità Pubblica, ^BDip. Di Medicina Sperimentale e Patologia, Università "La Sapienza", Roma. ^CDip. Scienze Ginecologiche, Perinatologia e Puericoltura del Policlinico Umberto I, Roma.

L'aborto spontaneo rappresenta, purtroppo, l'esito della gravidanza nel 15 % circa dei casi. I motivi di questo fenomeno sono di difficile identificazione, ma, tra i diversi fattori causali, l'infezione intrauterina svolge un ruolo importante. Micoplasmati genitali, *Chlamydia trachomatis*, diversi virus e molti altri microrganismi, che colonizzano la mucosa genitale, possono influenzare l'evoluzione clinica di una gravidanza. Obiettivo dello studio è stato quello di isolare agenti microbici in tessuti fetali e placentari, provenienti da aborti spontanei e da interruzioni volontarie di gravidanza (IVG), entrambi durante il primo trimestre. Con metodi convenzionali culturali e procedure diagnostiche molecolari sono stati ricercati: lieviti, batteri gram positivi/negativi, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma fermentans*, *Ureaplasma urealyticum*, *C. trachomatis*, papillomavirus genitali umani, virus dell'herpes simplex tipo 1 e 2, polyomavirus umani BKV e JCV e adenovirus. Tutti i campioni, derivanti da IVG, sono risultati negativi per la presenza di lieviti e batteri, solo il 4% è risultato positivo per la presenza del DNA di adenovirus. Negli aborti spontanei il 24% dei campioni è risultato positivo per la presenza di batteri, con una prevalenza del 35% per i micoplasmati genitali, del 21% per *Staphylococcus aureus*, del 14% per *Escherichia coli* e per *Streptococcus faecalis*, del 7% per *Corynebacterium* B e *Streptococcus agalactiae*, mentre lieviti, *C. trachomatis*, *Campylobacter* spp. e *L. monocytogenes* sono risultati assenti. La ricerca di virus ha evidenziato negli aborti spontanei una positività del 13% con una prevalenza del 67% per gli adenovirus e del 33% per BKV, mentre papillomavirus genitali umani, virus dell'herpes simplex tipo 1 e 2 e JCV sono risultati assenti. La presenza di BKV-DNA conferma la possibilità di una trasmissione materno-fetale per questo virus. Tra tutti i campioni risultati positivi il 22% è da riferirsi ad un singolo agente microbico ed il 5% a due o più microrganismi, essendo in quest'ultimo caso i micoplasmati i più frequentemente rappresentati. Da questo studio emerge l'esigenza di uno screening accurato nella madre durante il primo trimestre della gravidanza per la ricerca di agenti microbici usuali e non.

Ricerca finanziata con fondi MIUR.

BATTERI ISOLATI DA FISSATORI ORTOPEDICI UTILIZZATI NEL CANE

MARTINO P.A., BRISOTTO C., PONTI W., POLI G.

Dip. Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria – Sez. Microbiologia e Immunologia Facoltà di Medicina Veterinaria - Milano

L'ortopedia utilizza nell'uomo, per la riduzione di fratture o per la loro stabilizzazione, la tecnica della fissazione esterna e, attualmente, tale sistema viene applicato anche in medicina veterinaria. Come nell'uomo anche negli animali le maggiori complicanze *post-operatorie* sono rappresentate dalle infezioni del punto di inserzione dei chiodi (*pin tract infection*).

Nel cane, in particolare, vengono isolati *Staphylococcus intermedius*, *Actinomyces pyogenes* e *Pasteurella multocida* ma si osservano anche infezioni polimicrobiche sostenute da streptococchi, batteri Gram-negativi e da anaerobi, questi ultimi in genere sottostimati. L'adesione alle superfici degli impianti è legata alla formazione del *biofilm* che avvolge le colonie batteriche e la persistenza a modificazioni fenotipiche che permettono lo sviluppo di antibiotico-resistenza.

Scopo di questo lavoro è stato quello di isolare, identificare e valutare la sensibilità agli antibiotici dei batteri presenti sui fissatori ortopedici utilizzati nel cane e responsabili delle infezioni correlate alla loro applicazione.

Sono stati esaminati 47 campioni, rappresentati da tamponi prelevati dal punto di inserzione dei fissatori e da chiodi e fili di *kirschner*, che, appena giunti al laboratorio, sono stati immediatamente seminati su terreno *agar-sangue* oppure in *Tryptic Soy Broth*. Dopo incubazione a 37 °C per 18-24 ore in aerobiosi si è proceduto all'identificazione dei ceppi isolati e all'esecuzione degli antibiogrammi.

Il batterio più frequentemente isolato è risultato *St. intermedius* (36,17%), sensibile agli antibiotici β -lattamici testati e ai fluorochinoloni, seguito da *Pseudomonas aeruginosa* (17,02%), resistente a tutti gli antibiotici testati. Nell'8,5% dei casi si sono osservate infezioni miste e il 10,64% dei campioni è risultato sterile.

Si può ritenere che il ruolo di *St. intermedius*, commensale della cute del cane, sia legato alla possibilità di colonizzare, a livello del punto di infissione dei fissatori, i tessuti profondi difficilmente raggiungibili dagli antibiotici; invece, la persistenza di *Ps. aeruginosa* può essere spiegata con l'elevata antibiotico-resistenza, che caratterizza tutto il genere. Importante è anche la co-presenza di più specie batteriche, in quanto meccanismi sinergici potrebbero alterare le risposte alla terapia.

In conclusione, ci sentiamo di suggerire il monitoraggio microbiologico dei fissatori ortopedici al fine di prevenire l'insorgenza di osteomieliti o di altre complicanze settiche.

BLOCCO DELL'ATTIVITÀ ENHANCER DEL VIRUS DELL'EPATITE B (HBV) DA UNA SEQUENZA DI DNA DI *PARACENTROTUS LIVIDUS* CON PROPRIETÀ DI ISOLATORE CROMATINICO.

¹Bonura C., ²Cascio S., ²Di Simone P., ¹Ferraro D., ¹Di Stefano R., ³Craxì A., ²Spinelli G.

¹Dipartimento di Igiene e Microbiologia, Università degli Studi di Palermo;

²Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università degli Studi di Palermo;

³Cattedra di Gastroenterologia, Istituto di Clinica Medica, Università degli Studi di Palermo.

Gli analoghi nucleosidici non ottengono una inibizione della trascrizione del HBV-DNA integrato. Abbiamo quindi valutato la possibilità di bloccare gli *enhancers* di HBV mediante l'elemento di confine cromatinico *sns* (*silencing nuclear sequence*) del gene H₂A degli istoni del riccio di mare *Paracentrotus lividus* di cui è stata dimostrata una attività inibitoria su *enhancers* e *promoters* eterologhi.

Sono state generate costruzioni plasmidiche contenenti l'enhancer I o II di HBV, transfettate poi *in transient* individualmente in colture di epatociti umani neoplastici (HuH7). L'espressione del gene *reporter* (*Enhanced Green Fluorescent Protein*, EGFP) è stata valutata in fluorescenza nelle costruzioni contenenti le unità trascrizionali.

Le cellule transfettate con le costruzioni contenenti gli *enhancers* di HBV a monte del promotore eterologo *tk* esprimevano una intensa EGFP positività, indicando una espressione attiva del gene *reporter*. Negli epatociti transfettati con *sns* posto tra *enhancer* e *promoter*, la EGFP era nettamente ipoespressa, per interferenza fra *sns* ed espressione del *reporter*. La fluorescenza si manteneva intensa anche nelle cellule transfettate con una sequenza spaziatrice al posto di *sns*, dimostrando che l'aumento della distanza tra *enhancer* e *promoter* non interferisce con l'espressione del *reporter*. È importante sottolineare che la intensità di fluorescenza nelle cellule transfettate con le costruzioni contenenti *sns* era sovrapponibile a quella degli epatociti transfettati con il solo *promoter*, confermando che anche per l'HBV la presenza di *sns* blocca l'attività degli *enhancers* riportando l'espressione del gene *reporter* al livello basale.

L'analisi di diversi cloni di cellule HuH7 stabilmente transfettate con le varie costruzioni plasmidiche ha confermato che l'*sns* mantiene la funzione di "*enhancer blocker*" anche dopo l'integrazione nel DNA genomico di epatociti umani *in vitro*.

BRACHYSPIRA AALBORGI PER LA PRIMA VOLTA ISOLATA IN ITALIA DA DUE CASI DI SPIROCHETOSI INTESTINALE UMANA.

Calderaro A., Dettori G., Ragni P., Piccolo G., Bommezzadri S., Zuelli C., Conter M.¹, Villanacci V.², Lanzarotto F.³, Guégan R., Giordano R., Arcangeletti M.C., Medici M.C., Manca N.⁴, Perandin F.⁴, Chezzi C.

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio-Sezione di Microbiologia,¹ Dipartimento di produzioni animali, biotecnologie veterinarie, qualità e sicurezza degli alimenti-Università di Parma;²Seconda divisione di Anatomia Patologica³Secondo Dipartimento di Patologia Chirurgica,⁴Istituto di Microbiologia, Università di Brescia.

Brachyspira aalborgi, spirocheta debolmente beta-emolitica attualmente ritenuta agente eziologico di spirochetosi intestinale umana, è stata isolata fino ad oggi in soli due casi. In questo studio riportiamo per la prima volta in Italia l'isolamento di *B. aalborgi* mediante un metodo messo a punto nel nostro laboratorio e la sua caratterizzazione fenotipica e genetica.

Una paziente con diarrea mucosa, rettorragia e sospetto carcinoma del retto e un paziente con addominalgie protratte per quasi un anno sono stati sottoposti a colonscopia. Biopsie rettali sono state sottoposte ad esame istologico e ad osservazione al microscopio elettronico. Campioni di feci e biopsie rettali sono stati utilizzati per l'isolamento di spirochete intestinali utilizzando il terreno Blood Agar Modificato addizionato di Spectinomomicina e Rifampicina (BAM-SR). Aliquote degli stessi campioni sono state sottoposte ad estrazione del DNA seguita da amplificazione di una sequenza del DNA 16S specifica del genere *Brachyspira* e analisi dei frammenti di restrizione (RFLP). Inoltre, gli ampliconi sono stati sottoposti ad analisi della sequenza comparativamente al ceppo tipo della specie *B. aalborgi* 513A^T.

L'esame istologico e l'osservazione al microscopio elettronico delle biopsie ha evidenziato l'adesione di numerosi microrganismi spiraliformi alla membrana degli enterociti. Dopo 48h dall'inoculo dei campioni biologici in piastre di BAM-SR, è stata osservata la comparsa di colonie debolmente beta-emolitiche piccole e trasparenti. Le caratteristiche fenotipiche e genetiche degli isolati erano quelle tipiche della specie *B. aalborgi*. L'analisi della sequenza genica degli ampliconi ha mostrato una identità con quella del ceppo di riferimento.

Questo studio riporta, per la prima volta in Italia, l'isolamento di *B. aalborgi* da feci umane e per la terza volta al mondo da campioni di origine umana. Le caratteristiche fenotipiche e genetiche, il sequenziamento degli amplificati e l'appaiamento delle sequenze hanno dimostrato che il ceppo di riferimento e i ceppo isolati potevano essere considerati identici.

CARATTERISTICHE DI PATOGENICITÀ DI BATTERI ISOLATI DALL'AMBIENTE ACQUATICO.

Pruzzo C.^a, Tarsi R.^a, Zampini M.^a, Lleò M. M.^b, Signoretto C.^b, Canepari P.^b, Falzano L.^c, Donelli G.^c

^a*Istituto di Microbiologia e Scienze Biomediche, Università di Ancona, Via Ranieri Monte d'Ago, 60131 Ancona;*

^b*Dipartimento di Patologia, Sezione di Microbiologia, Università di Verona, Strada Le Grazie 8, 37134 Verona, ^cIstituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma;Italy.*

Lo studio dei batteri eterotrofi presenti nelle acque, delle loro caratteristiche di patogenicità e delle strategie messe in atto per sopravvivere agli stress ambientali ha consentito di chiarire alcuni aspetti della patogenesi delle malattie a trasmissione idrica e di valutare criticamente l'affidabilità dei saggi tradizionali utilizzati per il controllo microbiologico delle acque. E' stato dimostrato che nell'acqua sono presenti microorganismi indigeni (ad esempio *Vibrio* spp), potenzialmente patogeni per l'uomo, la cui concentrazione non è correlabile con quella degli indicatori fecali. Nonostante ciò, non vengono ricercati di routine nè sono stati ancora definiti protocolli standard per il loro rilevamento. E' stato anche dimostrato che molti batteri eutrofi, patogeni e non patogeni, possono persistere nell'ambiente in forma "vitale ma non coltivabile (VBNC)". I batteri VBNC non crescono nelle condizioni colturali utilizzate tradizionalmente ma possono riattivarsi in seguito ad esposizione ad adeguati stimoli. Poiché in ambiente acquatico queste forme sono predominanti e possono conservare le caratteristiche di patogenicità, la loro presenza può rappresentare una minaccia per la salute dell'uomo. In questo lavoro vengono presentati i dati più recenti di uno studio condotto sulle caratteristiche di patogenicità di batteri isolati dalle acque e sul mantenimento delle caratteristiche adesive di vibriani ed enterocchi dopo attivazione dello stato VBNC. I risultati ottenuti con ceppi appartenenti a diverse specie di *Vibrio* hanno dimostrato la potenziale patogenicità dei vibriani di derivazione ambientale. I nostri risultati hanno anche dimostrato che i batteri in stato VBNC sono in grado di aderire alle cellule epiteliali intestinali sebbene meno efficientemente delle forme vegetative.

CARATTERISTICHE FENOTIPICHE E GENOTIPICHE DI CEPPI DI STREPTOCOCCI B EMOLITICI DI GRUPPO A RESISTENTI O SENSIBILI ALL'ERITROMICINA.

P. Catalanotti, G. Scarallo, M.R. Catania, M. Lucido, M. Roselli, S. Martini, F. Gallè, S. Concilio, F. Rossano

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di microbiologia e microbiologia clinica, Seconda Università di Napoli (S.U.N.)

Streptococcus pyogenes è responsabile di malattie che vanno dalla faringite alla fascite necrotizzante.

In letteratura sono riportati sempre più frequentemente isolamenti di ceppi di *S. pyogenes* eritromicino-resistenti. Si conoscono due differenti modalità di eritromicino-resistenza: la prima consiste nella metilazione del sito bersaglio ed è legata al gene *erm*; è espressa nel fenotipo MLS_B , che può essere costitutivo ($cMLS_B$) o inducibile ($iMLS_B$); la diversa inducibilità fa distinguere tre sottotipi: $iMLS_B$ -A, $iMLS_B$ -B e $iMLS_B$ -C. Il secondo meccanismo, che consiste nell'attivazione di una pompa di efflusso per i macrolidi a 14 e 15 atomi, è legato, invece, al gene *mefA* (fenotipo M). In Italia, in varie regioni, si riportano incidenze di ceppi resistenti all'eritromicina oscillanti tra il 35 e il 43%.

In questa ricerca riportiamo gli aspetti epidemiologici riferiti al sierotipo (antigeni T), al fenotipo di resistenza e all'invasività. Sono, inoltre, riportati i pattern dell'elettroforesi in campo pulsante (PFGE).

L'indagine è stata effettuata su 65 ceppi di *S. pyogenes* isolati da una popolazione abbastanza omogenea, nei laboratori del Dipartimento Assistenziale di Diagnostica microbiologica della S.U.N.

Relativamente al sierotipo T, circa il 25% dei ceppi è risultato positivo al pool W; il 13% dei ceppi si è dimostrato T+ o U+. Una percentuale minima è rappresentata da ceppi X+ e Y+. Infine 8 ceppi non sono stati agglutinati dai sieri polivalenti utilizzati e altri 7 ceppi si sono dimostrati positivi a più antisieri. L'analisi del pattern PFGE ha evidenziato polimorfismo genetico di specie. Nell'ambito dei diversi sierotipi T si è osservata tuttavia una discreta omogeneità. Relativamente alle capacità invasive, evidenziate nel 10% dei ceppi, non si è osservata alcuna correlazione con il sierotipo T, il genotipo o la resistenza all'eritromicina. Per quanto riguarda l'eritromicino-resistenza, invece, si è osservata una stretta correlazione tra la sensibilità o resistenza all'eritromicina e la tipizzazione molecolare e/o fenotipica. La resistenza all'eritromicina è stata riscontrata nel 15% dei ceppi. I fenotipi di resistenza M, $cMLS_B$ e $iMLS_B$ -A sono stati riscontrati ciascuno in 3 ceppi, mentre il fenotipo $iMLS_B$ -B è stato evidenziato in uno solo dei dieci ceppi resistenti. Nessun ceppo resistente è risultato appartenente al fenotipo $iMLS_B$ -C.

CARATTERIZZAZIONE BIOCHIMICA DELLA $ES\beta L$ CTX-M-3 IPERPRODotta IN UN SISTEMA PET

Mariagrazia Perilli, Daniela Ettore e Gianfranco Amicosante

Cattedra di Biochimica e Biologia Molecolare Clinica, Università degli Studi di L'Aquila

Le β -lattamasi ad ampio spettro d'azione ($ES\beta L$) sono enzimi batterici prodotti da molti microrganismi gram-negativi che attualmente rappresentano un grave problema dal punto di vista clinico in quanto coinvolgono i pazienti ospedalieri di tutto il mondo. La maggior parte delle $ES\beta L$ si sono sviluppate in seguito all'introduzione in terapia clinica di antibiotici β -lattamici, quali le oximiinocefalosporine. A questa famiglia appartengono un gruppo molto eterogeneo di enzimi come le β -lattamasi TEM, SHV, PER, CTX-M, etc le quali sembrano avere anche una diversa origine filogenetica. Le CTX-M rappresentano un gruppo relativamente piccolo di $ES\beta L$ ma sono caratterizzate da una elevata attività idrolitica verso il cefotaxime (1). Questi enzimi non sono strettamente correlati alle TEM ed SHV (omologia di sequenza pari al 40%) per cui non è possibile ricorrere alle strutture cristallografiche di quest'ultime per spiegare la correlazione fra alcuni elementi strutturali ed l'attività idrolitica delle CTX-M.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di esprimere la CTX-M-3 (2), che deriva dal suo capostipite la CTX-M-1, in un sistema di overespressione in modo da ottenere delle cospicue quantità di enzima per studi funzionali e strutturali. A tal proposito il gene codificante per la CTX-M-3 è stato amplificato mediante PCR e clonato nel vettore di espressione pET-9a. La β -lattamasi CTX-M-3 è stata purificata, mediante due tappe cromatografiche in FPLC, da 8 L di coltura batterica e sono stati ottenuti 270 mg di proteina con grado di purezza superiore al 95%. Con tale sistema di iperproduzione si è ottenuta una resa pari a 34 μ g di CTX-M-3 purificata per ml di coltura batterica. Il profilo del substrato per l'enzima CTX-M-3 è stato effettuato mediante analisi cinetica utilizzando diversi antibiotici β -lattamici come piperacillina, benzilpenicillina, cefaloridina, cefazolina, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, aztreonam e nitrocefina. Per tutti i substrati riportati la β -lattamasi CTX-M3 mostrava una elevata efficienza catalitica (valori di k_{cat}/K_m compresi tra 0.29 e 21.7 $\mu M^{-1}s^{-1}$) tranne che per il ceftazidime che si comportava quale povero substrato ($k_{cat}/K_m = 6.6 \times 10^{-4} \mu M^{-1}s^{-1}$). La CTX-M-3 mostrava anche una discreta efficienza catalitica ($k_{cat}/K_m = 0.051 \mu M^{-1}s^{-1}$) verso l'atreonam, considerato un antibiotico stabile per gli enzimi della famiglia CTX-M.

Bradford P. A. 2001. Clin. Microbiol. Rev. 14: 933-951

Gniadkowski M. et al. 1998.. Antimicrob. Agents Chemother. 42 (4): 827-832

CARATTERIZZAZIONE DELLA PATHOGENICITY ISLAND DI 68 *Helicobacter pylori* ISOLATI DA BIOPSIA GASTRICA

Fabbro A., L. Dolzani, C. Lagatolla, EA. Tonin, E. Edalucci, F. Gionechetti e C. Monti-Bragadin
Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Trieste.

In questa ricerca sono stati studiati in 68 ceppi di *Helicobacter pylori* sette geni uniformemente distribuiti lungo la pathogenicity island (cag PAI). In particolare sono stati amplificati con multiplex-PCR i geni: *cag?*, *cagY* e *cagT* nella regione *cagII* e *cagQ*, *cagL* e *cagE* (oltre a *cagA*) nella *cagI*.

In questo modo abbiamo potuto dimostrare che accanto a ceppi con PAI completa (31 ceppi pari al 45.6%) o con PAI totalmente assente (29 ceppi, 42.6%) esistono ceppi con PAI incompleta. Più in particolare abbiamo identificato: 3 ceppi con PAI priva di *cagA*, un ceppo privo di *cagE* e *cagQ*, un ceppo mancante di *cagA*, *cagL* e *cagQ* e, infine un ceppo con PAI priva di *cagE*, *cagL*, *cagQ* e *cagY*. Considerando i campioni che presentano pathogenicity island incompleta, i geni che risultano deleti con maggiore frequenza sono *cagA* (quattro casi su sei) e *cagQ* (tre casi su sei). Questi dati ci fanno pensare che *cagA* non rappresenti un buon marker per la ricerca della PAI e che per questo scopo debbano invece essere utilizzati geni della regione *cagII*. Per quanto concerne il ruolo della pathogenicity island sembra che una *cag* PAI parzialmente deleta corredi con patologie relativamente lievi. La mancata dimostrazione di IS605 nei ceppi con PAI deleta fa escludere l'ipotesi (Censini et al. (1996) PNAS **93**:14648-14653) di una possibile relazione causale fra la sequenza di inserzione e le delezioni nella *cag* PAI. Non si può invece escludere che sia la escissione della IS a determinare l'instabilità della PAI.

CARATTERIZZAZIONE DELLE INTERAZIONI FUNZIONALI TRA GENOMA VIRALE E PROTEINA NUCLEOCAPSIDICA DEL VIRUS DELL'IMMUNODEFICIENZA FELINA

Mauro Pistello¹, Mila Moscardini¹, Damien Ficheux², Jennifer T. Miller³, Valentina Camerini¹, Stuart F.J. Le Grice³, Witold K. Surewicz⁴, Caroline Gabus, Jean-Luc Darlix⁵ e Mauro Bendinelli¹.

¹Centro Retrovirus e Sezione Virologia, Dipartimento di Patologia Sperimentale, B.M.I.E., Università di Pisa; ²IBCP-CNRS, Lione, Francia, ³HIV Drug Resistance Program, NCI-Frederick, Frederick, MD, USA, ⁴Department of Pathology, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA, ⁵INSERM-ENS, Lione, Francia.

La proteina nucleocapsidica (NC) dei retrovirus, costituita da un dominio globulare centrale con due *zinc finger* fiancheggiati da residui aminoacidici basici, è essenziale per la replicazione dei retrovirus. Mediante sistemi *in vitro* che riproducono l'interazione della NC con il genoma virale è stato dimostrato che NC promuove la sintesi di DNA genomico da parte della trascrittasi inversa (RT) e la sua integrazione nel genoma della cellula ospite ed ha un ruolo fondamentale nell'assemblaggio di particelle virali infettanti mediante selezione, dimerizzazione e *packaging* dell'RNA genomico.

Al fine di individuare possibili approcci terapeutici e strategie vaccinali anti-AIDS abbiamo caratterizzato i domini funzionali e le modalità di interazione della NC del virus dell'immunodeficienza felina (FIV), un lentivirus simile ad HIV ed usato come modello di studio per l'AIDS. Abbiamo messo a punto un modello di studio *in vitro* che utilizza le porzioni 5' e 3' di FIV-RNA come molecole *target* e le proteine NC ed RT di FIV. Data la particolare struttura chimica di NC, sia la proteina nativa sia le proteine delete degli *zinc finger* (NCdd) e dell'estremità aminotermine (NC C-term) sono state sintetizzate chimicamente.

I risultati mostrano che i domini funzionali della NC di FIV sono localizzati negli *zinc finger* e nell'estremità aminotermine che, come per gli altri lentivirus, NC promuove dimerizzazione dell'RNA, annealing di tRNA^{Lys},³ al PBS, sintesi e trasferimento del filamento negativo di cDNA. Al contrario però di quanto osservato per HIV-1 ed altri retrovirus, in FIV le sequenze dell'RNA genomico importanti per la dimerizzazione sono localizzate a monte del PBS (Moscardini *et al.*, *J. Mol. Biol.* 2002). Sulla base di questi risultati ed allo scopo di ottenere virus produttori virioni senza il genoma virale al suo interno, sono stati prodotti cloni molecolari di FIV contenenti mutazioni nelle regioni di interazione tra genoma virale ed NC. La cinetica di replicazione *in vitro*, la produzione di particelle virali e l'infettività residua dei cloni mutati sono in fase di valutazione.

CARATTERIZZAZIONE DI DUE CLONI CIRCOLANTI IN ITALIA DI *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* DI SIEROTIPO 6B SENSIBILI ALLA PENICILLINA

Maria Del Grosso¹, Giovanni Gherardi², Fabio D'Ambrosio¹, Anna Scotto d'Abusco¹, Giordano Dicuonzo², Annalisa Pantosti¹

¹Laboratorio di BATTERIOLOGIA e MICOLOGIA MEDICA, Istituto Superiore di Sanità, ²Dipartimento di Medicina di Laboratorio e Microbiologia, Università Campus Bio-Medico, Roma

La resistenza agli antibiotici in ceppi di *S.pneumoniae* è in notevole aumento in tutto il mondo con diffusione di particolari cloni multiresistenti (MDR). Recentemente è stato descritto un clone di sierotipo (st) 6B, sensibile alla penicillina (PEN) ma resistente a eritromicina (ERY), clindamicina (CLIN), tetraciclina (TET), cloramfenicolo (CAF) e trimetoprim-sulfametossazolo (SXT), isolato in Grecia da portatori sani e definito "clone Mediterraneo" che differisce da uno dei cloni MDR più diffusi nel mondo, lo Spain^{6B}-2, per la sensibilità alla PEN. In questo studio sono stati esaminati 29 ceppi di *S.pneumoniae*, isolati in Italia, provenienti da malattie invasive o da portatori sani, appartenenti al st 6B. Tutti i ceppi analizzati erano sensibili alla PEN, 10 con fenotipo di resistenza ERY, CLIN, TET, CAF e SXT e 19 con pattern diversi. Allo scopo di stabilire una eventuale relazione clonale e un confronto con cloni precedentemente descritti, i ceppi sono stati tipizzati mediante PFGE, PCR-RFLP e sequenza del gene *pspA*, e MLST. I saggi utilizzati hanno permesso di suddividere gli isolati in 10 diversi gruppi di cui 2 predominanti. I 12 isolati del I gruppo presentavano pulsotipo simile al clone Spain^{6B}-2, antibiotipo compatibile con il "clone Mediterraneo" e un unico profilo RFLP di *pspA*. La sequenza di *pspA* su un ceppo ha riportato 100% di identità aminoacidica con il clone Spain^{6B}-2. MLST su 2 ceppi rappresentativi ha evidenziato profili identici al "clone Mediterraneo". I 9 isolati del II gruppo presentavano pulsotipi correlati; 3 isolati erano resistenti a ERY e TET e 6 sensibili agli antibiotici testati. RFLP di *pspA* ha dato diversi profili. MLST su 3 ceppi rappresentativi ha evidenziato un ceppo con profilo allelico identico ad un ceppo invasivo di st 6B isolato in UK e 2 ceppi con una variante in uno dei 7 alleli esaminati. Saggi di PCR sul gene *int* e long-PCR hanno identificato nel I gruppo e nei ceppi resistenti del II gruppo un trasposone (*Tn1545*-like) portatore dei geni *erm* e *tet*. I risultati ottenuti dimostrano la circolazione in Italia di due cloni prevalenti di st 6B di cui uno molto omogeneo rappresentato dal "clone Mediterraneo" con caratteristiche genotipiche di resistenza simili al clone Spain^{6B}-2.

CARATTERIZZAZIONE DI LIEVITI ANTAGONISTI VERSO PATOGENI ALIMENTARI

S. Laconi*, G. Lampis**, D. Deidda**, C. Pittau** e R. Pompei*

*Sezione di Microbiologia Applicata, Università di Cagliari e **Biotecne, Cagliari

Recenti studi hanno permesso di osservare che lieviti isolati da vari campioni alimentari sono in grado di rallentare o inibire la crescita di alcuni batteri patogeni, che comunemente possono contaminare cibi non cotti, in particolare *Staphylococcus aureus* e, in minor misura, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Candida tropicalis*. Su 45 ceppi di lieviti isolati da formaggi, insaccati o vegetali sottolio, quasi la metà (21) hanno manifestato qualche forma di attività antagonista verso almeno uno dei patogeni saggiati.

Metodi e Risultati. Un ceppo di lievito del genere *Candida*, indicato con la sigla 20aS, isolato da formaggio, è stato caratterizzato per l'attività antagonista su vari patogeni in coltura mista. Questo ceppo è stato analizzato su 17 terreni diversi per composizione e concentrazione di zucchero. E' risultato che esso mostrava una significativa azione antagonista in terreni base non tamponati contenenti lattosio o glucosio in concentrazione tra l'1 e il 2%, mentre era totalmente inattivo in terreni contenenti maltosio, fruttosio, saccarosio e galattosio. Con lo stesso ceppo sono state fatte una serie di prove in terreni liquidi, allo scopo di evidenziare le curve di crescita dei vari batteri patogeni in coltura singola o mista. In quest'ultimo caso l'inoculo del patogeno è stato fatto a diversi tempi, a partire dall'ora 0, fino a 24h, 48h, o 72h dall'inoculo del lievito antagonista. Dalle curve di crescita ottenute, si è potuto osservare che ancora una volta l'azione antagonista più rilevante si è riscontrata in Casitone +2% di lattosio. In questo terreno, il lievito 20aS ha inibito totalmente i ceppi di *Listeria* L3 e L4, lo *S. aureus* e l'*E. coli*, mentre in *Skim milk* si è osservato un rallentamento della crescita (circa 3 logaritmi di differenza nelle UFC/ml dopo 3 giorni di crescita in confronto al controllo), sia delle *Listerie* che dello *Stafilococco*.

Commento: Questi dati fanno pensare che la capacità che il lievito 20aS mostra nell'inibire la crescita dei batteri patogeni sia da mettere in relazione alla produzione di sostanze o metaboliti attivi, probabilmente acidi organici originati dal metabolismo degli zuccheri. I lieviti con queste caratteristiche sono allo studio per la possibilità di contrastare le tossinfezioni alimentari o per la produzione di ceppi con proprietà probiotiche.

Questo lavoro è stato finanziato dalla Fondazione Banco di Sardegna e dal Centro Regionale di Programmazione della Regione Sardegna.

CARATTERIZZAZIONE DI UN PROFAGO ANALOGO A *GIFSY-2* IN *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR ABORTUSOVIS.

D.Bacciu^a, A. Spazziani^a, G. Falchi^a, G. Marogna, G. Leori, M.A. Mura^a, G. Fenu^a, S. Rubino^a, S. Uzzau^a

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

^bIstituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari

La conversione lisogenica da parte dei batteriofagi temperati sembra svolgere un ruolo chiave nell'evoluzione adattativa dei batteri patogeni. Il nostro modello per lo studio dell'associazione tra lisogenia e adattamento all'ospite è rappresentato dal serovar Abortusovis, specifico per gli ovini nei quali causa aborto e, negli agnelli neonati, infezioni a carattere sistemico. L'analisi comparativa dell'assortimento di fagi di virulenza con il serovar Typhimurium mostra che serovar Abortusovis è *Gifsy-1*[-] ma possiede un elemento simile a *Gifsy-2* (*Gifsy-2AO*). Per determinare l'effetto della rimozione dell'elemento *Gifsy-2AO* sulla virulenza del serovar Abortusovis, abbiamo coinfectato agnelli di 1-2 mesi con il ceppo mutante *Gifsy-2AO*[-] e il ceppo selvaggio, e valutato la competizione tra i due ceppi nei diversi tessuti a 3-4 giorni dopo l'infezione. Il ceppo selvaggio e il mutante sono stati recuperati in un numero comparabile dai polmoni e dall'intestino, ma il primo ha prevalso significativamente nella colonizzazione dei tessuti profondi. Dal momento che l'adattamento di Abortusovis nell'ospite ovino correla con la persistenza batterica nei siti sistemici, abbiamo ipotizzato che i fattori di adattamento all'ospite di Abortusovis potrebbero essere codificati dagli elementi come *Gifsy-2AO*. La region 'b' del profago *Gifsy-2AO* è stata sequenziata; l'analisi della sequenza, mostra un'ampia delezione rispetto alla stessa regione del serovar Typhimurium. La delezione comprende i geni *stfT* e *tfaT*, che codificano per proteine delle fibre della coda del fago, e gli ipotetici geni di virulenza *gtgB*, *gtgC*, e parte del gene *gtgD*. La sequenza *gtgD* è interrotta da una sequenza di inserzione 99% identica alla sequenza *IS1414* di *E. coli* Enterotossigenico. La sequenza *IS1414* contiene un gene per la trasposasi (*tnpA*) e, all'interno di questo gene è presente il gene *astA* che codifica per l'enterotossina EAST1. Nell'evoluzione della patogenicità di *Salmonella*, verso forme di virulenza adattate a specifici animali, il trasferimento di geni di virulenza mediante conversione lisogenica e il successivo riarrangiamento in serovar specifici (Abortusovis), potrebbe aver giocato un ruolo primario, facilitando la sopravvivenza del patogeno in differenti nicchie ecologiche e potenziando le sue capacità di superare le barriere difensive dell'animale ospite.

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI EPSTEIN-BARR ISOLATI DA LINEE CELLULARI IMMORTALIZZATE DERIVATE DA PAZIENTI CON LINFOMI CUTANEI A CELLULE T.

M. A. De Francesco, P. Esteban, K. Bertelli, F. Gargiulo, F. Perandin, L. Terlenghi, P.G. Calzavara e N. Manca

Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Brescia, Italia

I linfomi cutanei a cellule T rappresentano dei linfomi eterogenei non-Hodgkin's tra cui la micosi fungoide e la variante leucemica della sindrome di Sézary sono i più comuni. Sebbene l'eziologia di tali patologie non sia stata identificata, è stato ipotizzato che una prolungata stimolazione antigenica indotta da virus possa contribuire al loro sviluppo implicando alternativamente come fattori eziologici sia il virus di Epstein-Barr (EBV) che una doppia infezione con il virus della leucemia T dell'adulto (HTLV) ed EBV.

Noi abbiamo allestito colture di cellule mononucleate di sangue periferico (PBMCs) da 29 soggetti con micosi fungoide e da 20 soggetti sani. Sei linee cellulari sono cresciute spontaneamente *in vitro* dai pazienti con micosi fungoide e sono state caratterizzate fenotipicamente mediante analisi citofluorimetrica. Queste linee erano CD19⁺ e non esprimevano markers appartenenti alla linea T o NK, esprimevano alti livelli dei markers di attivazione CD38 e HLA-DR, il recettore CD23 tipico delle linee linfoblastoidi e molecole di adesione quali il CD44. Il DNA genomico estratto da queste cellule ha rivelato mediante amplificazione genica la presenza di DNA di EBV. Poiché alcune proteine di latenza del virus EBV quali LMP-1 e EBNA-2 giocano un ruolo essenziale nella trasformazione cellulare ed il polimorfismo associato con questi geni può essere messo in relazione sia con le loro capacità oncogene che con il tipo di ceppo virale coinvolto, abbiamo analizzato la presenza di eventuali mutazioni, delezioni o inserzioni presenti nei geni EBNA 2, LMP-1 e LMP-2 rispetto alla linea di riferimento B95-8.

I risultati hanno dimostrato che tutte le linee cellulari contenevano EBV di tipo 1. Due linee cellulari presentavano nella regione carbossiterminale di LMP-1 una delezione di 33 bp compresa tra i codoni 345-355, una linea presentava una delezione di 72 bp compresa tra i codoni 333-355, mentre le altre tre linee mantenevano il genotipo originale. Tutte le linee cellulari presentavano le stesse mutazioni puntiformi (P58F, P70F, I85L, F106Y) nella regione transmembrana di LMP-1 e le stesse mutazioni (Y18D, Q77P) a livello del gene della proteina di latenza LMP-2. E' significativo che tutte le linee immortalizzate abbiano un ceppo di EBV di tipo1, associato ad una maggiore capacità trasformante, con la presenza in 3 linee di una variante deleta di LMP-1 dotata di maggior potere oncogeno. Lo sviluppo *in vitro* di queste linee linfoblastoidi immortalizzate con EBV in pazienti affetti da micosi fungoide consente di effettuare ulteriori studi per chiarire i meccanismi patogenetici della progressione della malattia.

MONITORAGGIO DELLE INFEZIONI DA CYTOMEGALOVIRUS IN SOGGETTI IMMUNOCOMPROMESSI

Rosalia Graffeo, Stefania Manzara, Simona Marchetti, Stefania Ranno, Paola Cattani e Giovanni Fadda
Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Il Cytomegalovirus (CMV) è caratterizzato, come tutti i virus appartenenti alla famiglia degli *Herpesviridae*, dalla capacità di stabilire infezioni latenti che possono andar incontro a riattivazioni soprattutto in particolari condizioni cliniche. L'infezione da CMV è un'importante causa di morbilità e mortalità nei soggetti immunodepressi.

Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la presenza di un'infezione attiva da CMV analizzando 70 campioni di sangue provenienti da pazienti ricoverati presso i reparti di Ematologia e Trapianti d'Organo del Policlinico "A. Gemelli" dell'Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma. A tale fine sono state utilizzate tre metodiche diagnostiche: la ricerca di antigeni virali (pp65) nel sangue periferico (antigenemia per CMV), una PCR qualitativa e la Real-Time PCR.

Su 34 dei 70 campioni raccolti è stato possibile eseguire l'antigenemia per CMV che è risultata positiva nel 17.7% dei casi. Gli stessi 34 campioni, previa estrazione del DNA totale, esaminati con la Real-Time PCR sono risultati positivi nel 38.6% dei casi. Per i restanti 36 campioni, con un numero di cellule insufficiente per eseguire l'antigenemia, la Real-Time PCR è stata valutata in confronto con una PCR qualitativa eseguita su plasma e la sensibilità delle due metodiche è risultata sovrapponibile (38.6% di positivi con la Real-Time e il 33.4% con la PCR qualitativa).

I risultati ottenuti mostrano che la metodica molecolare della Real-Time PCR può essere una valida alternativa sia all'antigenemia, soprattutto per i campioni con un numero insufficiente di polimorfonucleati frequenti nei pazienti immunocompromessi, sia ad una PCR qualitativa, con il vantaggio di poter avere un risultato quantitativo, particolarmente utile per il monitoraggio delle infezioni attive e per l'eventuale controllo della risposta ad una terapia antivirale specifica.

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI *MYCOPLASMA HOMINIS* ASSOCIATI AD ISOLATI CLINICI DI *TRICHOMONAS VAGINALIS*

¹Daniele Dessì, ²Gunna Christiansen, ¹PierLuigi Fiori

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

²Institut 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: un eucariote, *Trichomonas vaginalis*, e un procariote, *Mycoplasma hominis*. Scopo di questo lavoro è stato quello di effettuare una caratterizzazione molecolare di *M. hominis* isolati dalla nostra collezione di isolati clinici di *T. vaginalis*, sia a livello fenotipico che genomico. Questa caratterizzazione è stata effettuata utilizzando tecniche di Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), SDS-PAGE ed immunoblotting con anticorpi mono- e policlonali diretti contro le principali proteine di superficie di *M. hominis*.

Lo studio della variabilità delle principali proteine di superficie (vaa, P120, Imp) non ha rivelato la presenza di varianti di *M. hominis* specificamente associate a *T. vaginalis*. Infatti, è stato dimostrato un grado di variabilità intraspecifica che non si discosta da quello normalmente riscontrato in ceppi batterici isolati da pazienti non affetti da tricomoniasi. Inoltre, le diverse varianti delle proteine studiate e la loro espressione, non sono correlabili con la localizzazione intra- od extracellulare del batterio. Per quanto riguarda lo studio della variabilità genotipica, sono stati effettuati esperimenti di PFGE seguiti da analisi dei profili elettroforetici e calcolo delle dimensioni del genoma. Su 15 isolati analizzati, è stato possibile individuare 8 pattern elettroforetici differenti.

I risultati ottenuti suggeriscono che:

i ceppi di *M. hominis* che stabiliscono un rapporto simbiotico con *T. vaginalis* non differiscono dai ceppi che vengono normalmente isolati da pazienti non affetti da tricomoniasi: non è quindi ipotizzabile l'esistenza di una variante subspecifica di *M. hominis* che, in vivo, si associ preferenzialmente a *T. vaginalis*;

non esistono varianti specifiche delle principali proteine di superficie di *M. hominis* che rendano possibile l'interazione fra i due microorganismi o che siano correlate con la localizzazione extra- od intracellulare dei diversi isolati di *M. hominis* analizzati.

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI ROTAVIRUS P[8]G9 ISOLATI A PALERMO.

S. Arista¹, M. C. Migliore¹, S. De Grazia¹, G. M. Giammanco¹, A. Cascio².

1. Dipartimento di Igiene e Microbiologia, Università di Palermo; 2. Clinica delle Malattie Infettive, Università di Messina.

I Rotavirus di gruppo A, agenti di gastroenterite in età pediatrica, sono responsabili di elevata morbilità e mortalità. In base alla caratterizzazione delle due proteine di superficie VP7 (G) e VP4 (P) sono classificati in numerosi tipi antigenici. Ceppi con specificità P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3 e P[8]G4 sono largamente diffusi e ubiquitari, mentre ceppi con altre specificità sono responsabili di casi sporadici in aree geografiche limitate. Recentemente, episodi di gastroenterite da rotavirus di tipo P[8]G9 e P[6]G9 sono stati segnalati in alcune regioni degli Stati Uniti, Australia, Asia ed Europa.

In Italia, nell'ambito di uno studio epidemiologico sulla circolazione di rotavirus in pazienti di età <3 anni ospedalizzati nel periodo agosto 1999 - luglio 2000 per enterite acuta, in 7 centri dislocati sul territorio nazionale, sono stati tipizzati 447 ceppi di rotavirus, 153 dei quali provenienti da Palermo. La caratterizzazione antigenica e genomica dei ceppi palermitani ha rivelato che il 19% di essi mostrava una specificità P[8]G9. In particolare, essi costituivano il terzo tipo per frequenza dopo quelli con specificità P[8]G1 (42%) e P[8]G4 (33%).

Allo scopo di indagare su possibili correlazioni tra i ceppi italiani P[8]G9 e ceppi con la stessa specificità riscontrati in altri Paesi, è stata effettuata una analisi genetica mediante amplificazione e sequenziamento del gene VP7. I risultati ottenuti hanno mostrato che gli isolati palermitani sono geneticamente omogenei. Infatti, essi presentano una identità del 100% nella sequenza analizzata (934 basi). Le sequenze ottenute sono filogeneticamente affini a quelle di ceppi di rotavirus con specificità P[8]G9 recentemente isolati in Nigeria e Brasile (identità 99,5%), mentre sono distanti da ceppi di provenienza indiana (identità 88,3%) e cinese (identità 89,6%), oltre che dai ceppi di riferimento WI61 ed F45 (identità 89%). E' possibile che i ceppi P[8]G9 circolanti in Sicilia siano stati introdotti da soggetti infetti provenienti da tali Paesi.

Questa è la prima segnalazione di una diffusa circolazione di ceppi con specificità P[8]G9 in Italia, dal momento che finora erano stati evidenziati solo sporadicamente.

Studi sulla composizione di un idoneo vaccino anti-rotavirus sono in corso da numerosi anni. Il diffondersi di infezioni con ceppi di tipo G9 deve indurre a considerare l'opportunità di includere anche questa specificità nelle nuove formulazioni vaccinali.

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI MALASSEZIA SPP. ISOLATA DA PAZIENTI AFFETTI DA PITYRIASIS VERSICOLOR E IN SOGGETTI SANI.

Oliveri Salvatore, Campanile Floriana, Greco Anna Marisa, Bongiorno Dafne, Longobardo Stefania e Stefani Stefania
Dipartimento di Scienze Microbiologiche - Università degli Studi di Catania

E' stato messo a punto un sistema basato sull'amplificazione genica e la restrizione delle regioni ITS e LSU per l'identificazione e la caratterizzazione molecolare di alcune specie di *Malassezia*, isolate da pazienti affetti da pityriasis versicolor e da soggetti normali.

I trenta ceppi inclusi nello studio (14 da patologie, 15 da pazienti sani e un ceppo di controllo) sono stati inoltre identificati con metodiche fenotipiche tradizionali quali l'identificazione morfologica, la reazione alla catalasi, l'idrolisi dell'esculina, l'assimilazione dei Tween, la crescita a 40°C ed il test dell'ureasi.

I risultati ottenuti mediante PCR e successiva restrizione ci hanno permesso di distinguere inequivocabilmente diverse specie all'interno del genere, risolvendo un elevato numero di errate identificazioni. Tredici ceppi di *M.furfur*, 1 di *M.sympodialis* ed 1 di *M.globosa* sono stati isolati da pityriasis versicolor, mentre queste ultime due specie mostravano una frequenza maggiore nella popolazione sana (circa 50%).

Il successivo sequenziamento della regione ITS1 di due ceppi di *M.globosa* e 1 ceppo di *M.sympodialis* mostra regioni altamente conservate e regioni variabili all'interno della specie facendo ipotizzare un uso di questa sequenza negli studi di tipizzazione molecolare. Inoltre l'allineamento delle sequenze all'interno del genere, utilizzando il programma ClustalW versione 1.7, ha messo in evidenza una significativa differenza della regione che si estende dal 5' del gene 18S a tutto il blocco centrale.

In conclusione l'amplificazione della regione ITS con primers specifici consente una rapida identificazione di questi organismi; inoltre la variabilità intraspecifica presentata può consentire l'uso di questa sequenza per studi di tipizzazione molecolare.

CEPPI DI ENTEROCOCCHI CON DETERMINANTI GENETICI MULTIPLI PER VANCOMICINO-RESISTENZA

Lavenia A.¹, G. Scialino¹, EA. Tonin¹, L. Dolzani¹, C. Lagatolla¹, A. Cavallero², M. Clementi², F. Gionechetti¹ e C. Monti-Bragadin¹

1. Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Trieste. 2. Laboratorio di Microbiologia, Università Vita-Salute S. Raffaele Milano.

In questo studio sono stati caratterizzati: due ceppi di VRE isolati presso l'Ospedale di Trieste (A23 e B1), due ceppi isolati all'Ospedale di Vicenza (V5 e V6) e dodici ceppi isolati nel corso dell'anno 2001 presso l'Ospedale San Raffaele di Milano, indicati con le sigle da M1 a M12. Tutti gli isolati esaminati erano tra loro non correlati come dimostrato dall'analisi di restrizione con *Sma*I.

Tutti i ceppi hanno dimostrato di essere fertili negli esperimenti di coniugazione, donando i determinanti della vancomicina-resistenza ad opportuni riceventi. Il DNA totale estratto dai ceppi VRE e dai rispettivi coniugati è stato amplificato mediante *Long-PCR*, utilizzando un primer unico che riconosce una sequenza presente nelle *inverted repeat* (IR) terminali del trasposone Tn1546. Molti dei ceppi così saggiati, in particolare A23, M1, M2, M5, M6, M7, M8, M9, M10 e 228, hanno fornito un unico amplicone di 10.8 kb, che digerito con *Cla*I ha fornito frammenti delle dimensioni attese per Tn1546. Altri ceppi invece hanno fornito risultati più o meno anomali ed inattesi. La *Long-PCR* dei due ceppi V5 e V6 ha dato origine ad ampliconi di lunghezza leggermente superiore. La successiva digestione degli amplificati con *Cla*I, *Eco*RI e *Pvu*II ha permesso di concludere che il ceppo V5 ha un'inserzione di circa 1.5 kb tra i geni *vanY* e *vanZ* del trasposone Tn1546, mentre il ceppo V6 ha un inserto leggermente più corto all'interno del gene *vanZ*. Nel ceppo V6 il trasposone Tn1546 si trova su un plasmide di circa 33 kb, mentre il ceppo V5 è portatore di due diversi plasmidi ibridizzabili con la sonda *vanA*.

I ceppi B1, M3, M4, M11 ed M12 mostravano invece, dopo la separazione elettroforetica degli amplificati, una banda della lunghezza attesa di 10.8 kb ed un'altra dotata di una mobilità apparente corrispondente ad una lunghezza circa doppia. I risultati ottenuti mediante l'analisi di restrizione effettuata su tutti gli ampliconi con gli enzimi *Cla*I, *Eco*RI, *Pvu*II, *Nru*I e *Sal*I suggeriscono la presenza di due copie non-identiche del trasposone Tn1546 la cui amplificazione darebbe origine ad un eterodimero dotato di migrazione anomala corrispondente alla banda di lunghezza pressochè doppia. La probabile inserzione, che differenzia le due copie di Tn1546 presenti negli stessi ceppi, è posta tra il terzo sito di taglio di *Cla*I ed il secondo sito di taglio di *Eco*RI.

CHLAMYDIA TRACHOMATIS E MICOPLASMI GENITALI NELL'INFERTILITÀ DELLA DONNA.

Gallinelli C. (*) Chiarini F. (*) Nicotra M. (**) Nicosia R. (*)

(*) Sezione di Microbiologia - Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica. Università "La Sapienza" - Roma

(**) II Clinica Ostetrica e Ginecologica. Università "La Sapienza" - Roma

Riassunto

Da vari studi è emersa la possibilità che, oltre *Chlamydia trachomatis*, alcune specie di Micoplasmi genitali, quali *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis*, possano essere associate con infertilità, aborto o prematurità. Il problema è ancora controverso per cui abbiamo voluto approfondire, in uno studio epidemiologico, la possibile correlazione tra presenza di tali microrganismi ed infertilità nella donna. METODO: La presenza di *C.trachomatis*, *U.urealyticum* e *M.hominis* è stata indagata in un campione di 350 donne afferenti all'ambulatorio per la Sterilità della Clinica Ginecologica dell'Università "La Sapienza" di Roma ed in un gruppo controllo costituito da 80 donne fertili afferenti all'ambulatorio ostetrico della medesima clinica universitaria. Sono stati prelevati tamponi endocervicali ed analizzati con metodiche di immunofluorescenza per la ricerca di *C.trachomatis* e con esame colturale per la ricerca di Micoplasmi genitali. E' stata inoltre saggiata la sensibilità agli antibiotici dei Micoplasmi. RISULTATI: La frequenza di infezione da *C.trachomatis* è stata sul totale dei soggetti del 6,8 %, quella da Micoplasmi genitali del 26,6% mentre la percentuale di coinfezione è stata del 2,6%. Nelle donne con sterilità secondaria i Micoplasmi genitali sono rappresentati quasi esclusivamente da *U.urealyticum* presente nel 40,4% dei casi. I micoplasmi genitali sono risultati resistenti per il 48% all'eritromicina e per l'8% alla ofloxacina. CONCLUSIONI: Questo studio ha evidenziato la presenza di *C.trachomatis* e di Micoplasmi genitali nelle pazienti infertili, suggerendo, in particolare, una possibile responsabilità diretta dei Micoplasmi nella patogenesi di questo quadro clinico. Per quanto riguarda l'efficacia terapeutica, l'eritromicina non risulta essere il farmaco ideale per la terapia delle infezioni da Micoplasmi.

CIRCOLAZIONE EPIDEMICA DI UN CLONE DI *SALMONELLA* HEIDELBERG IN ITALIA: STUDIO MOLECOLARE.

Caracappa S., Di Noto A.M., Oliveri G., Lo Verde V., Mammina C.*, Cannova L.* , Nastasi A.**.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" - Palermo

* Dipartimento di Igiene e Microbiologia G. D'Alessandro Università degli Studi di Palermo

** Dipartimento di Sanità Pubblica Università degli Studi di Firenze

Salmonella Heidelberg è un sierotipo che in Italia infrequentemente è responsabile di casi di enterite nell'uomo. In altri Paesi, soprattutto nel Nord America, la prevalenza di questo sierotipo risulta relativamente elevata soprattutto in alimenti di origine animale e negli allevamenti avicoli. Nei primi mesi del 2002, la coincidenza tra un piccolo scoppio epidemico intrafamiliare verificatosi a Pistoia, un caso di enterite di un bambino a Palermo e l'isolamento di un ceppo da un campione di frattaglie di pollo, commercializzate su scala nazionale, ha suggerito l'opportunità di verificare la possibile correlazione clonale tra gli stipiti. Questi sono stati sottoposti al saggio di sensibilità ai chemioantibiotici e tipizzati con metodiche di biologia molecolare. La resistenza ad ampicillina e sulfonamidi è stata riscontrata nei 5 stipiti esaminati che condividevano anche lo stesso profilo plasmidico, caratterizzato dalla presenza di due plasmidi di circa 90 e 30 Megadalton. La PFGE del DNA cromosomico ha definitivamente confermato l'appartenenza degli stipiti in esame allo stesso clone. Un'indagine retrospettiva sugli stipiti di *Salmonella* Heidelberg identificati in Sicilia, ha messo in evidenza un ulteriore stipite isolato presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale durante il 2001 da frattaglie di pollo. Quest'ultimo stipite, pur mostrando un antibiogramma diverso - resistenza ad ampicillina, streptomycin, tetracicline ed acido nalidixico - e un diverso profilo plasmidico, è apparso tuttavia caratterizzato da un pattern elettroforetico del DNA cromosomico del tutto identico ai precedenti.

Dai dati descritti si può formulare l'ipotesi di una stretta correlazione epidemiologica tra i ceppi isolati nelle diverse regioni d'Italia e del probabile ruolo nel circuito di contagio degli alimenti a base di pollo. Il ridotto numero di stipiti disponibili, non consente una ricostruzione accurata dell'evento, ma

l'osservazione di pattern di PFGE sovrapponibili, in ceppi fenotipicamente eterogenei, appare compatibile con l'ipotesi della disseminazione di un singolo clone in grado di acquisire determinanti genetici di resistenza differenziati in relazione ai diversi ecosistemi colonizzati da questo sierotipo.

CLONAGGIO E SEQUENZA DI UN GENE DI *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBP. *PARATUBERCULOSIS* CODIFICANTE PER UNA FIBRONECTIN BINDING PROTEIN.

Duprè L., Zanetti S., Mura M., Delogu G., Fadda G. e L.A. Sechi.

Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia Sperimentale e Clinica, Università degli studi di Sassari, Viale S. Pietro 43/B, 07100 Sassari, Italy.

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* è responsabile della malattia di Johne nei ruminanti, una malattia cronica intestinale che debilita e porta a morte l'animale infetto. Il morbo di Crohn, una malattia infiammatoria cronica del tratto gastro-intestinale dell'uomo, nonostante sia stato correlato con il *M. paratuberculosis* sin dal 1913, rimane una malattia di cui non si conoscono con certezza le cause. Recentemente sempre più lavori confermano il ruolo patogeno di *M. paratuberculosis* nel morbo di Crohn. In questo studio, è stata intrapresa una ricerca dei fattori di virulenza di *M. paratuberculosis* mediante un confronto con i fattori di virulenza noti di *M. tuberculosis*. Uno dei fattori cruciali del processo infettivo è l'adesione del batterio alla mucosa intestinale e l'eventuale disseminazione nel tratto gastrointestinale. Una ricerca in diversi database, ha messo in evidenza un'omologia del 90% a livello nucleotidico di un gene di *M. paratuberculosis* con il gene di *M. tuberculosis* HBHA codificante per una fibronectin binding protein. Il gene è stato clonato e sequenziato e l'omologia è risultata essere molto alta anche a livello proteico. Il gene è stato subclonato in *Mycobacterium smegmatis* in pMV261, un vettore shuttle di espressione per micobatteri e *Escherichia coli*, e la proteina è stata espressa in *M. smegmatis* ma non in *E. coli*. Ulteriori studi di caratterizzazione della adesione sono in corso

CLONAZIONE, ESPRESSIONE E PURIFICAZIONE DEL GENE DELLA DIVISIONE CELLULARE *FtsZ* DELLO *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*.

S. Petruzzelli, D. Fadda, M.C. Pischedda, M.A. Marcialis e O. Massidda

Dip. Sc. Chirurgiche, sez. Microbiologia, Università di Cagliari

La proteina FtsZ, presente in quasi tutti i batteri e gli archaea, è una proteina chiave nella formazione del setto: si localizza per prima nel sito di divisione dove polimerizza formando un anello contrattile ("Z-ring") che determina il piano di divisione e recluta le altre proteine coinvolte nel processo di divisione cellulare. Strutturalmente l'FtsZ è simile alla tubulina delle cellule eucariotiche, con la quale condivide, oltre ad una significativa omologia di sequenza, la capacità di idrolizzare il GTP e di polimerizzare in presenza di GTP formando lunghi tubuli. In *Escherichia coli* questa proteina è essenziale per la sopravvivenza della cellula, come dimostrato da esperimenti di inattivazione del gene che la codifica e dalla presenza di cellule filamentose, incapaci di dividersi in alcuni mutanti FtsZ.

Nonostante il gene *ftsZ* sia stato ormai identificato in un gran numero di batteri, inclusi i cocchi Gram-positivi, la sua funzione in questi batteri rimane poco studiata e i modelli di riferimento per la divisione cellulare rimangono i bastoncini *E. coli* e *B. subtilis*. Allo scopo di caratterizzare l'FtsZ dello *Streptococcus pneumoniae* abbiamo clonato il gene *ftsZ* (*spnftsZ*) in *E. coli* DH5 α , utilizzando il vettore di espressione pBAD. In questo vettore l'espressione del gene ricombinante è regolata dal promotore *araBAD*, inducibile mediante l'aggiunta di arabinosio e reprimibile mediante l'aggiunta di glucosio al terreno di coltura. L'analisi dei cloni, eseguita mediante determinazione della curva di crescita ed esame microscopico a contrasto di fase dei campioni prelevati ogni 30 min, ha dimostrato che l'espressione del gene *spnftsZ* in *E. coli* produce un rallentamento della crescita e la formazione di filamenti osmoticamente stabili dopo induzione con arabinosio; effetti che non si osservano in presenza del repressore.

Allo scopo di purificare l'FtsZ dello *S. pneumoniae* abbiamo clonato il gene *spnftsZ* in *E. coli* DH5 α , utilizzando il vettore di espressione pRSETA. Dopo aver verificato la corretta sequenza del frammento clonato, abbiamo utilizzato differenti ceppi di *E. coli* idonei alla produzione di proteine ricombinanti e abbiamo selezionato il sistema di espressione più efficiente. In questo modo abbiamo ottenuto la nostra proteina con un elevato grado di purezza.

Questo lavoro rappresenta una fase iniziale necessaria per la caratterizzazione biochimica e funzionale della proteina FtsZ in un modello per i cocchi Gram-positivi.

COMPARSA DI MULTIVARIANTI DI ESBL CTX-M IN ENTEROBATTERI ISOLATI IN UN OSPEDALE DEL NORD ITALIA.

¹Migliavacca R., ²Dell'Amico E., ¹Nucleo E., ²D'Andrea M., ¹Zara F., ³Spalla M., ²Rossolini G.M., ¹Pagani L..

¹Dipartimento Scienze Morfologiche, Eidologiche e Cliniche, sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Pavia.

²Dipartimento di Biologia Molecolare, sezione di Microbiologia, Università di Siena.

³Laboratorio di Analisi Microbiologiche dell'I.R.C.C.S. S.Matteo di Pavia.

Gli enzimi di tipo CTX-M rappresentano un gruppo di beta-lattamasi a spettro esteso di classe A, caratterizzate da una maggiore attività idrolitica verso il cefotaxime che verso il ceftazidime e, conseguentemente, MIC del cefotaxime più alte rispetto al ceftazidime.

Recentemente, il rapido sviluppo della famiglia CTX-M ha coinvolto *Enterobacteriaceae* diffuse per lo più in tre aree geografiche: Sud America, Europa ed estremo oriente, ma queste ESBL non sono mai state segnalate, fino ad oggi, in Italia.

Materiali e Metodi. 49 enterobatteri ESBL produttori, che risultavano positivi con il test di sinergia co-Amoxi-Clav, sono stati raccolti durante un periodo di dieci mesi (ottobre 2001- luglio 2002) presso il Servizio di Analisi Microbiologiche dell'I.R.C.C.S. S.Matteo di Pavia. I test di sensibilità con ceftazidime e cefotaxime sono stati eseguiti seguendo le procedure standard di disco-diffusione e di diluizione in brodo raccomandate dall'NCCLS. Sono inoltre stati eseguiti esperimenti di coniugazione, isoelettrofocalizzazione, un saggio biologico sugli estratti enzimatici grezzi e una caratterizzazione molecolare mediante PCR utilizzando una coppia di *primer* appositamente disegnata per rilevare tutte le varianti note di geni per CTX-M, associata a sequenziamento diretto dei prodotti di amplificazione.

Risultati. Negli estratti ottenuti da tutti i ceppi studiati è stata confermata la presenza di ESBL, caratterizzate da differenti valori di punto isoelettrico; solo in alcuni casi questi ultimi risultavano compresi tra 7.9 e 8.4 e con una spiccata attività idrolitica sul cefotaxime.

Negli stessi ceppi l'analisi molecolare ha permesso di identificare la presenza di 2 varianti: la CTX-M-2 e la CTX-M-15. Gli isolati clinici risultati CTX-M positivi, provenivano da cinque reparti (medici, chirurgici e di lungodegenza) e presentavano alti livelli di resistenza al cefotaxime (MIC 32->128 μ g/ml). Le MIC del ceftazidime erano comprese tra 2 e 8 μ g/ml.

La disseminazione di 2 varianti CTX-M (-2 e -15) ha interessato 3 specie della famiglia delle *Enterobacteriaceae*: *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.vulgaris* raccolti all'interno di un solo ospedale.

ATTIVITÀ ANTI-ADENOVIRUS DELLA LATTOFERRINA: ANALISI DEL MECCANISMO DI AZIONE

E. Superti¹, A. M. Di Biase¹, A. Pietrantonio¹, A. Tinari¹, M. Marchetti¹, G. Antonini², P. Valenti³, L. Seganti⁴

¹ Laboratorio di Ultrastrutture, Istituto Superiore di Sanità, Roma

² Dipartimento di Biologia, III Università di Roma

³ Dipartimento di Medicina Sperimentale, II Università di Napoli

⁴ Dipartimento di Sanità Pubblica, Università "La Sapienza", Roma

La lattoferrina è una glicoproteina monomerica, del peso molecolare di circa 80 kDa, appartenente al gruppo delle transferrine, composta da una singola catena polipeptidica suddivisa in due lobi globulari simmetrici (lobo N e lobo C), ciascuno dei quali può legare un atomo di ferro. 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. Sebbene l'attività antivirale della lattoferrina rappresenti un'importante funzione biologica, il meccanismo attraverso il quale tale proteina svolge la sua azione non è stato ancora definito. In questa ricerca abbiamo analizzato il meccanismo d'attività antivirale della lattoferrina e, in particolare, il ruolo del lobo C, del lobo N e della lattoferrina, un peptide derivato dalla porzione N-terminale della molecola, utilizzando come modello l'adenovirus di tipo 2 e le cellule HEp-2: lo stesso sistema virus-cellula in cui abbiamo precedentemente dimostrato l'attività anti-adenovirus della lattoferrina. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il lobo C non è implicato nell'attività anti-adenovirus della lattoferrina che, invece, è mediata principalmente dal lobo N e, in particolare, dalla sequenza aminoacidica 17-41 corrispondente al peptide N-terminale lattoferrina. Inoltre i nostri studi hanno dimostrato che la lattoferrina esplica la sua attività competendo con il virus per il legame a recettori cellulari comuni appartenenti alla classe dei glicosaminoglicani.

COMUNITA' DI PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA DI UN SUOLO CONTAMINATO DA METALLI PESANTI

E. Dell'Amico, L. Cavalca, V. Andreoni¹

¹ Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche, Università degli Studi di Milano-Via Celoria 2, 20133 Milano

Diverse tecnologie emergenti e di interesse crescente per il clean up di suoli contaminati sono basate sull'impiego di piante e dei microrganismi ad esse associati. Le piante metallo-tolleranti, oltre essere usate per vegetare e controllare l'erosione di scarti di miniere e di cumuli di rifiuti, possono essere utilizzate per accumulare i metalli presenti nei suoli inquinati e così rimuoverli. L'efficienza di fitoaccumulazione dipende essenzialmente dalla capacità delle piante di assorbire ed accumulare grandi quantità di metalli e di produrre elevate quantità di biomassa.

I rizobatteri che promuovono la crescita delle piante (PGPR), interagendo con i sistemi radicali, possono concorrere a mitigare la tossicità dei metalli pesanti anche nei confronti di piante metallo resistenti ed accumulanti. Tra i meccanismi di promozione della crescita delle piante, oltre la fissazione dell'azoto, vanno annoverati la sintesi di siderofori, la produzione di fitormoni, la solubilizzazione del fosforo e la produzione batterica dell'ACC deaminasi, enzima capace di idrolizzare il precursore dell'etilene prodotto dalle piante prevenendone così l'accumulo in condizioni di stress ambientale.

Per ricercare la presenza di questi batteri e studiarne le caratteristiche di metallo resistenza sono state analizzate comunità microbiche rizosferiche di piante erbacee cresciute in un suolo ad elevato contenuto di metalli pesanti.

La diversità genetica di queste comunità rizosferiche è stata studiata mediante analisi molecolare del DNA estratto direttamente dal suolo e dalle colture di arricchimento condotte in presenza di Cd e Zn e in presenza di 1-aminociclopropano-1-carbossilato (ACC), precursore dell'etilene, come unica fonte di azoto.

E' stato così possibile isolare numerosi batteri metallo resistenti con caratteristiche di *plant growth promoting bacteria*, in particolare la capacità di produrre siderofori e di sintetizzare ACC deaminasi. Per alcuni di questi batteri, potenzialmente utilizzabili in processi di biorisanamento vengono riportate le caratteristiche fenotipiche e molecolari.

La batterizzazione di semi o l'inoculazione di suoli con questi ceppi potrebbe contribuire alla crescita di piante in ambienti dove la contaminazione da metalli è elevata.

CONFRONTO FRA IL SISTEMA DI RILEVAZIONE RAPIDA PLDH (OPTIMAL® RAPID MALARIA TEST), LA MICROSCOPIA E AMPLIFICAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI (PCR) NELLA DIAGNOSI DI MALARIA.

MASUCCI L., PLAISANT P., ROMANO L., NACCI A. e FADDA G.

Istituto di Microbiologia

Università Cattolica del Sacro Cuore - Policlinico "A. Gemelli" - L.go F. Vito, 1 00168 - Roma

L'esame microscopico del sangue rimane il gold standard per le diagnosi di malaria, tuttavia questa metodica è indaginosa e richiede personale altamente preparato.

Nell'arco di tempo dal Gennaio 2001 all' Agosto 2002, sono afferiti al nostro laboratorio (98) campioni di sangue per sospetto d'infezione da *Plasmodium* spp.

I campioni sono stati indagati con le seguenti metodiche: microscopia con colorazione Field's, OptiMAL® Rapid Malaria Test, amplificazione degli acidi nucleici (PCR) Kimura e Snononou.

Su un totale di (98), (25) sono risultati positivi e così ripartiti: *Plasmodium falciparum* (12), *Plasmodium vivax* (12), *Plasmodium ovale* (1), *Plasmodium malariae* (0).

Dai risultati da noi ottenuti nel confronto fra le tre metodiche, il sistema OptiMAL® Rapid Malaria Test è di valido aiuto nella diagnosi di infezioni da malaria in quelle zone dove non è possibile effettuare una buona microscopia, inoltre nei casi di diagnosi urgente.

Di notevole interesse è la diagnosi differenziale di *Plasmodium* spp che fornisce il test rapido: positività per *Plasmodium falciparum* oppure per le altre tre specie *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, individuando, quindi, la presenza o l'assenza d'infezione.

CONFRONTO TRA METODO COLTURALE ED AMPLIFICAZIONE GENICA PER IL RILEVAMENTO AMBIENTALE DI BATTERI DEL GENERE LEGIONELLA.

Raimondi, R. Ticozzi, A. Pessina, M.G. Neri.

Istituto di Microbiologia dell'Università degli Studi di Milano

Il genere Legionella comprende 42 specie batteriche almeno metà delle quali si sono dimostrate patogene per uomo.

Soggetti anziani, immunodepressi o con patologie polmonari croniche risultano particolarmente a rischio di infezione contratta, generalmente, attraverso l'inalazione di goccioline di acqua nebulizzata dalle docce o di aria contaminata dagli impianti di condizionamento. La maggior concentrazione di soggetti ad alto rischio in ospedali e case di riposo facilita l'insorgenza di piccole epidemie locali di Legionellosi, è quindi particolarmente importante, in queste strutture, la sorveglianza ambientale nei confronti delle Legionelle.

Attualmente, il metodo di riferimento per la ricerca delle Legionelle nelle reti di distribuzione dell'acqua o negli impianti di condizionamento è quello colturale e prevede la semina su terreni selettivi previa concentrazione ed acidificazione (o riscaldamento) dei campioni di acqua. Offre il vantaggio di consentire una successiva tipizzazione delle colonie isolate ma ha una bassa sensibilità.

Infatti la non facile coltivabilità del microrganismo e la interferenza di altri contaminanti ambientali possono contribuire ad una sottostima del livello di contaminazione da Legionelle.

La ricerca attraverso amplificazione di marcatori genetici è potenzialmente più sensibile ma la frequente presenza di inibitori della PCR limita la possibilità di una sua applicazione diretta ai campioni di acqua.

In questo studio abbiamo confrontato l'efficienza del rilevamento di batteri del genere *Legionella* in campioni ambientali ottenibile con amplificazione PCR semi-nested di un marcatore per il gene dell'rRNA 16S rispetto all'efficienza della metodica colturale di riferimento. I campioni di acqua sono stati amplificati come tali e dopo concentrazione per filtrazione, sia direttamente che dopo estrazione del DNA con metodica rapida. Su 31 campioni prelevati dalla rete idrica e dal sistema di condizionamento di case di ricovero per anziani, il metodo colturale ha evidenziato 8 positivi con carica superiore a 100 ufc/l (26%).

L'amplificazione diretta dal campione è risultata sempre negativa mentre, dopo concentrazione, tre campioni sono risultati positivi alla riamplicazione semi-nested (10%). Sensibilità di rilevamento maggiore è stata ottenuta da DNA estratto, infatti 7 (23%) e 11 (35%) campioni sono risultati positivi rispettivamente nella amplificazione primaria e nella semi-nested del DNA estratto dai campioni come tali mentre dal DNA estratto da campioni concentrati 10 (32%) sono risultati positivi alla prima amplificazione e 16 (52%) con la riamplicazione semi-nested.

CONFRONTO TRA PCR “REAL-TIME”, “NESTED” PCR E RIVELAZIONE DELL’ANTIGENE GALATTOMANNANO IN LAVAGGI BRONCOALVEOLARI PER LA DIAGNOSI DI ASPERGILLOSI POLMONARE IN PAZIENTI EMATOLOGICI

B. Posteraro*, M. Sanguinetti*, M. La Sorda*, T. Tognini*, M. Teti*, A. Franco*, L. Pagano[^] e G. Fadda*

*Istituto di Microbiologia e [^]Patologia Speciale Medica, Cattedra di Ematologia, Università Cattolica del S. Cuore, Roma

Sebbene il “gold standard” per la diagnosi di aspergillosi polmonare invasiva (IPA) sia a tutt’oggi rappresentato dalla coltura e dall’esame istologico, tali procedure sono di difficile attuazione nei pazienti con disordini ematologici a causa della frequente citopenia e delle condizioni critiche che ostacolano il prelievo di campioni biotici tissutali e dal fatto che campioni non invasivi come sangue e lavaggio broncoalveolare risultano spesso negativi all’esame colturale. Da qui la necessità di metodi non invasivi e al tempo stesso accurati che consentano di diagnosticare l’IPA in pazienti ad alto rischio. I metodi basati sulla PCR sembrano essere promettenti, come anche quelli consistenti nella determinazione dell’antigene galattomannano (GM). Per dimostrare la validità di tali procedure diagnostiche, 176 lavaggi broncoalveolari ottenuti da 44 pazienti affetti da malattie ematologiche, di cui 20 con IPA (secondo i criteri EORTC) e 24 controlli, sono stati analizzati mediante “nested” PCR, PCR “real-time” e determinazione in ELISA del GM.

La “nested” PCR è consistita nell’amplificazione di un frammento di 136 basi del DNA ribosomale 18S e nella visualizzazione su gel dell’amplificato. Anche la PCR “real time” prevedeva l’amplificazione di un frammento del DNA ribosomale 18S. In questo caso però, tale frammento è stato clonato nel plasmide pCR II, di cui sono state allestite diluizioni (da 10⁵ a 10 copie), in modo da costituire uno standard da utilizzare per l’analisi dei campioni clinici. La validità dello standard è stata testimoniata dalla linearità della curva di regressione (coefficiente di 0.986). Infine il test per la rivelazione del GM è stato utilizzato secondo le istruzioni della ditta produttrice.

Operativamente, il campione clinico da analizzare è stato suddiviso in quattro aliquote e quindi processato, oltre che per i test sopra esposti, anche per la coltura convenzionale.

Dall’analisi dei dati è risultato che il test GM era positivo in tutti i pazienti affetti da IPA, mentre la PCR “real-time” e la “nested” PCR lo erano per il 90% (18/20) e il 70% (14/20) dei pazienti, rispettivamente. Nessun campione del gruppo di controllo è risultato positivo ai tre test. Si può quindi affermare che la PCR, utilizzata in associazione con la determinazione di GM, può contribuire a migliorare la diagnosi di IPA.

CORRELAZIONE TRA CARCINOMA UROTELIALE DELLA VESCICA E INFEZIONI VIRALI.

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

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

Le neoplasie vescicali sono verosimilmente il risultato dell’interazione tra agenti carcinogeni e co-carcinogeni, ai quali si viene esposti per abitudini professionali, sociali e voluttuarie.

Da recenti studi sulla correlazione tra l’insorgenza di carcinoma vescicale e l’infezione da HPV (Human Papilloma Virus), emergono opinioni contrastanti sul ruolo eziologico dell’HPV nella carcinogenesi vescicale. Scarse inoltre sono le informazioni riguardanti l’associazione tra carcinoma vescicale e altri agenti virali.

In questo studio è stata valutata la relazione esistente tra infezioni virali da Poliomavirus BK e JC, HPV, Adenovirus e Herpesvirus HSV1 e HSV2 e 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 neoplasia vescicale (TURB). In corso di TURB sono stati prelevati frammenti di tessuto neoplastico per indagini istologiche e microbiologiche. La ricerca microbiologica è stata condotta mediante reazione polimerasica a catena (PCR).

I risultati ottenuti hanno evidenziato che il 42.4% dei soggetti esaminati (stadio di neoplasia TaG1 e TaG2) era positivo ad almeno uno degli agenti esaminati. Di questi il 78.5% era positivo alla ricerca per BKV; il 35.7% per BKV e JCV; il 14.2% per BKV, JCV ed Adenovirus; il 7.1% per BKV e HPV.

L’unico dato relativo al legame tra infezione e pattern istologico, emerso dal presente studio, riguarda l’alta incidenza di positività infettiva rilevata in campioni biotici di stadio TaG2.

In base ai risultati ottenuti è possibile ipotizzare un probabile ruolo delle infezioni da Poliomavirus (BKV e JCV), nell’eziopatogenesi del carcinoma uroteliale della vescica, mentre l’associazione tra HPV e carcinoma uroteliale della vescica non può essere confermata.

CORRELAZIONE TRA CITOLOGIA CERVICALE DEPONENTE PER ASCUS E L-SIL E POSITIVITÀ AL TEST HPV ALTO RISCHIO. OSSERVAZIONI PRELIMINARI.

¹Ciotti Marco, ¹Paba Pierpaolo, ¹Benedetto Arrigo, ²Sesti Francesco, ²Criscuolo Anna Angela, ²Piccione Emilio, and ¹Favalli Cartesio.

¹Laboratorio di Microbiologia Clinica e Virologia;

²Sezione di Ginecologia e Ostetricia;

Policlinico Universitario "Tor Vergata", Viale Oxford 81-00133 Roma, Italia.

I dati della letteratura riportano una positività HPV ad alto rischio compresa tra il 31% ed il 60% nelle donne con ASCUS (Wright TC: *Am J Obstet Gynecol*, 1998; Sherman ME: *J Natl Cancer Inst*, 2002) e fino al 83% nelle donne con L-SIL (ALTS, 2000).

E' noto d'altra parte che le più recenti linee guida per il trattamento di donne con anomalie citologiche cervicali prendono oggi giorno in considerazione anche la tipizzazione virale grazie allo sviluppo di metodiche molecolari sensibili.

L'obiettivo del presente studio prospettico di coorte da noi avviato a Maggio 2002 consiste nel correlare la presenza di HPV ad alto rischio con le lesioni cervicali minori (ASCUS ed L-SIL) citologicamente accertate. Sono state finora esaminate 15 casi di ASCUS e 15 di L-SIL. Dai campioni citologici eso ed endocervicali è stato estratto il DNA totale e successivamente analizzato con PCR usando primers degenerati (Bauer et al, Oxford Univ Press, 1992). I campioni positivi sono stati sottoposti a tipizzazione usando una miscela di primers per gli HPV a basso rischio (6,11) ed ad alto rischio (16,18,31,33,35,45,52,58). I risultati conseguiti hanno mostrato una positività per HPV ad alto rischio rispettivamente in 3/15 pazienti con ASCUS (20%) e in 4/15 con L-SIL (27%).

Tali osservazioni, seppure preliminari, confermano da un lato che le alterazioni citologiche ASCUS sono in una significativa percentuale di casi associate ad HPV ad alto rischio e dall'altro che le alterazioni L-SIL presentano una positività per HPV ad alto rischio maggiore rispetto all'ASCUS.

Saranno discusse le problematiche cliniche relative al significato della positività del test per HPV soprattutto nei casi di ASCUS con istologia negativa per CIN.

COSTO-EFFICACIA DEL TEST DI SENSIBILITÀ' ANTI-MICROBICA IN VITRO PER LA ERADICAZIONE DI *HELICOBACTER PYLORI*

M Romano, *MR Iovene, F Montella, *A Cuomo, MATufano.

Dip Microbiologia, *Cattedra Gastroenterologia, II Università di Napoli.

La presenza di ceppi di *H. pylori* resistenti agli anti-microbici comunemente adoperati nella terapia di tale infezione rappresenta il maggiore ostacolo ad una eradicazione che sia efficace nel 100% dei casi. Non è chiaro se la valutazione in vitro della sensibilità di *H. pylori* agli antimicrobici prima di iniziare la terapia eradicante (pretreatment susceptibility testing: P-ST) contribuisca ad una più efficiente eradicazione della infezione e sia costo-efficace. Scopo dello studio è stato: confrontare l'efficacia di due regimi, uno basato su P-ST e l'altro no, nell'eradicazione di *H. pylori*; valutare se P-ST sia costo-efficace. 150 pazienti dispeptici *H. pylori* positivi. In 75 pazienti la sensibilità in vitro alla amoxicillina (AM), claritromicina (CLA), tetraciclina (TET), e metronidazolo (MET) è stata accertata mediante E-test. Dopo randomizzazione, i pazienti sono stati trattati con omeprazolo (OME) 20 mg bid, CLA 500 mg bid, MET 500 mg bid, per sette giorni, oppure OME 20 mg bid e due antimicrobici scelti sulla base del risultato fornito dall'E test. Nel caso di resistenza sia alla CLA che al MET, abbiamo usato AM 1 g bid, TET 500 mg qid, subcitrato di bismuto 125 mg qid per 14 giorni. I pazienti di entrambi i gruppi che non erano risultati curati della infezione in seguito al primo ciclo di terapia sono stati trattati con OME 20 mg bid, TET 500 mg qid, MET 500 mg tid e subcitrato di bismuto 120 mg qid, per 14 giorni. La eradicazione è stata valutata 12 settimane dopo la fine del trattamento mediante ¹³C Urea breath test (UBT). Il test del chi-quadro è stato adoperato per valutare la significatività delle differenze sia nell'analisi Per Protocol (PP) che Intention To Treat (ITT). L'analisi della costo-efficacia si è basata sui costi di: visita gastroenterologica, endoscopia, RUT, istologia, coltura, E test, ¹³C UBT e farmaci. Due pazienti in ciascun gruppo sono usciti dallo studio; Tutti gli isolati sono risultati sensibili all' AM (MIC < 4 µg/ml) e alla TET (MIC < 2 µg/ml); il 22.5% è resistente al MET (MIC > 8 µg/ml), il 12.5% alla CLA (MIC > 2 µg/ml) e il 5% sia alla CLA che al MET; 3) Il tasso di eradicazione, nell'analisi PP ed ITT, rispettivamente, è stato del 97.3% (71/73) (95% CI: 100-90.3) e 94.6% (71/75) (95% CI: 86.6-98.6) nei pazienti sottoposti a P-ST e del 79.4% (58/73) (95% CI: 67.4-88.4) e 77.3% (58/75) (95% CI: 65.3-86.3) in quelli non sottoposti a P-ST (p<0.01); 4) 2/2 (gruppo P-ST) e 11/15 (gruppo non P-ST) si sono eradicati al termine del secondo ciclo di trattamento; 5) P-ST ha portato ad un risparmio di circa 12 euro per paziente. P-ST incrementa la percentuale di eradicazione in pazienti *H. pylori* positivi riduce sensibilmente i costi; P-ST dovrebbe essere effettuata di routine prima di iniziare terapia eradicante in soggetti con infezione da *H. pylori*.

DAI TLRs ALLE RISPOSTE TH: NUOVE FRONTIERE NELLE RISPOSTE IMMUNI, ALLERGICHE ED AUTOIMMUNI AI PARASSITI

Luigina Romani

Microbiologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università di Perugia, 06122 Perugia

La risposta immune ai microbi riposa sull'interazione reciproca tra immunità innata e quella adattativa specifica. L'immunità adattativa è mediata dai linfociti T e B che presentano recettori di riconoscimento dell'antigene distribuiti in maniera clonale. Responsabile della immunità adattativa sono i diversi "subsets" di cellule Th e la conseguente produzione di citochine effettrici da parte di queste. Le cellule Th "naive", se stimolate con antigeni presentati da cellule presentanti l'antigene (APCs), si differenziano in diversi "subsets" Th. Linfociti Th1, attraverso la produzione di interferone- γ (IFN- γ), promuovono principalmente un'immunità di tipo cellulare diretta contro patogeni intracellulari, cellule Th2, producendo interleuchina 4 (IL-4), IL-5 e IL-13, promuovono soprattutto un'immunità di tipo umorale coinvolta nel controllo di patogeni a sede extracellulare mentre linfociti T regolatori (Treg) regolano l'attività di entrambi queste popolazioni, attraverso diversi modalità, inclusa la produzione di IL-10 e di TGF- β . L'ambiente citochinico, in questa fase, è coinvolto in modo critico, essendo, ad esempio, IL-12, in grado di guidare la differenziazione in senso Th1 ed IL-4 in senso Th2, sebbene altre citochine "istruttive" partecipino al processo di polarizzazione Th. L'equilibrio tra i diversi "subsets" Th, nonché l'attività di cellule Treg, determina anche l'inizio e l'esito di un'ampia varietà di disturbi immunitari associati alle infezioni, incluse le malattie autoimmuni e quelle allergiche, talché una opportuna manipolazione di tali risposte può essere di beneficio terapeutico nelle infezioni e nelle patologie associate. Considerata inizialmente una risposta immediata e non specifica, caratterizzata dalla cattura e dall'ingestione di microrganismi e sostanze estranee da parte di fagociti, è ora evidente che l'immunità innata possiede almeno altri due fondamentali caratteristiche, che sono una considerevole specificità, essendo in grado di discriminare tra patogeni diversi e tra questi ed il "self" e la capacità di innescare l'immunità acquisita. L'attuazione di tali funzioni è resa possibile dalla presenza di una varietà di recettori presenti su cellule della reattività innata ed APCs, denominati PRRs, o "pattern-recognition receptors", capaci di riconoscere motivi strutturali altamente conservati nell'ambito dei patogeni, denominati PAMPs, o "pathogen-associated molecular patterns". Il coinvolgimento di svariati PRRs, ivi inclusi i Toll-like receptors (TLRs), da parte di PAMPs diversi dà luogo a risposte cellulari diverse, che vanno dalla semplice fagocitosi all'innescamento della risposta adattativa specifica, tramite la produzione citochinica e l'induzione di molecole di costimolazione. I risultati di studi recenti intrapresi in tale ambito depongono per un ruolo chiave dei diversi PRRs nel condizionare la risposta immune nel suo complesso e forniscono nuove basi conoscitive nell'ambito delle risposte immuni, autoimmuni ed allergiche ai diversi patogeni.

Finalizzato dal Progetto AIDS, contratto 50C.27

DETERMINAZIONE DEL JCV- E BKV-DNA MEDIANTE DUPLEX NESTED-PCR NELLE URINE E NEL SIERO DI TRAPIANTATI RENALI

Merlino C., Bergallo M., Giacchino F.*, Gregori G., Scutera S., Negro Ponzi A., Cavallo R.

Dip. Sanità Pubblica e Microbiologia, U.O.A.D.U. Virologia, Università degli Studi di Torino

**Dip. di Nefro-Urologia, U.O.A. Nefrologia e Dialisi, Ospedale Civile, Ivrea (Torino)*

Le infezioni da BKV e da JCV nei portatori di trapianto renale si verificano indipendentemente, ma possono anche verificarsi infezioni concomitanti e persistenza contemporanea di entrambi i virus. Questi soggetti sono suscettibili all'azione di entrambi i virus non solo come risultato della loro riattivazione, ma anche perché possono essere veicolati nell'organismo attraverso l'organo trapiantato. In numerosi studi il BKV è stato correlato con la nefrite interstiziale nei portatori di trapianto renale, in cui il trattamento immunodepressivo sembra indurre o almeno permettere la riattivazione del virus. In questi pazienti l'escrezione del virus nelle urine ha un'incidenza del 5-45% e la replicazione massiva del BKV nell'epitelio tubulare risulta nella perdita dell'organo in circa il 3-5% di essi. Recentemente è stato ipotizzato che nei trapiantati renali alcuni casi di nefropatia possano essere associati al JCV. Nel presente studio abbiamo valutato l'incidenza delle infezioni da JCV e BKV in 51 pazienti sottoposti a trapianto renale determinando la presenza del DNA di entrambi i virus mediante una duplex nested-PCR, nei campioni di urine e di siero di questi soggetti. Al momento dello studio nessun paziente ha presentato rigetto acuto o nefropatia; i risultati ottenuti sono stati correlati con il tipo di terapia immunosoppressiva e con la funzionalità renale. L'infezione attiva, indicata dalla presenza del DNA virale nelle urine e/o nel siero, è stata dimostrata nel 27,4% dei pazienti per quanto riguarda il JCV, nel 62,7% per il BKV e nel 15,7% per entrambi contemporaneamente. In relazione alla terapia immunodepressiva, per quanto riguarda il JCV, il 15,7% dei pazienti in Ciclosporina A (CyA) vs. l'11,8% di quelli in tacrolimus (FK506) ha presentato infezione attiva, mentre per quanto riguarda il BKV, il 41,2% dei pazienti in CyA vs. il 31,4% di quelli in FK506. Per quanto riguarda la funzionalità renale, il 64,3% dei pazienti con infezione attiva da JCV ed il 75% di quelli con infezione da BKV, ha presentato livelli di creatinina sierica < 2mg/dl. Il 14,3% dei pazienti con infezione da JCV vs. il 6,3% di quelli con infezione da BKV ha presentato una funzionalità renale più compromessa (creatinina sierica > 3 mg/dl).

DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DI ESTRATTI DI *Rumex scutatus* L.

R. Costanzo *, F. Caccamo *, A. Speciale *, A. Rapisarda °, S. Franco *, L. Iauk * e R. Musumeci *

* Dipartimento di Scienze Microbiologiche – Università di Catania

° Dipartimento Farmaco-Biologico – Università di Messina

Gli estratti ottenuti da foglie, radici e semi di varie specie del genere *Rumex* (Polygonaceae) dimostrano possedere attività antinfiammatoria, antiossidante, antimicrobica, analgesica ed antipiretica.

Tali estratti sono particolarmente ricchi in composti antrachinonici, tannini e flavonoidi.

Rumex scutatus L. è una pianta endemica dell'Etna e cresce nella fascia di vegetazione compresa tra i 900 e i 2600 m. Come altre piante tipiche di questa fascia altitudinale, *R. scutatus* è in grado di insediarsi su suoli poverissimi e sopravvivere in condizioni climatiche estremamente rigide. Le popolazioni viventi sulle lave dell'Etna hanno portamento ridotto (fino a 50 cm), foglie pubescenti e arrossate e sono state descritte come *R. aetnensis* C. Presl. = *R. pubescens* Guss.

Poiché a tutt'oggi non sono stati effettuati studi riguardanti le proprietà possedute da *R. scutatus* L., abbiamo pensato di valutare l'attività antimicrobica di questa pianta.

Gli estratti etanolico, etero ed acquoso delle foglie e delle radici di *R. scutatus* sono stati testati su ceppi ATCC di *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*.

Sono stati presi in considerazione anche ceppi di origine nosocomiale.

L'attività antimicrobica degli estratti preparati è stata valutata determinando la Concentrazione Minima Inibente (MIC) con il metodo della broddiluizione scalare al doppio, conformemente alle procedure tecniche raccomandate dal National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS 2001).

L'attività degli estratti è stata paragonata all'attività dell'antibiotico ciprofloxacina e dell'antimicotico amfotericina B.

L'estratto etanolico di foglie ha dimostrato possedere la migliore attività antimicrobica nei confronti dei batteri Gram-positivi da noi saggiati.

DETERMINAZIONE DI HHV 6-DNA NEL SIERO E LIQUOR DI PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIE DEMIELINIZZANTI

M.Cuzzola, C.Russo*, A.Cuzzocrea, O.Iacopino, U.Aguglia*, F.Morabito, P.Iacopino

CTMO, Dipartimento Emato-Oncologia, *Unità Operativa Neurologia; OO.RR Reggio Calabria

INTRODUZIONE. Il potenziale ruolo degli agenti virali nell'eziopatogenesi della sclerosi multipla (SM) è stato oggetto di numerosi studi. Recentemente, un β herpes virus denominato Human Herpes Virus 6 (HHV-6) è stato rilevato in soggetti affetti da SM. L'ipotesi di una probabile relazione tra SM ed infezione da HHV-6 è supportata dalla peculiare diffusione epidemiologica del virus, dal suo spiccato neurotropismo, dalla possibilità che esso induca una risposta immunologia cellulo-mediata ed, infine, dalle evidenze sperimentali ottenute in modelli animali che suggeriscono come l'evento demielinizzante sia virus-mediato. **SCOPO DELLO STUDIO:** Valutazione dell'incidenza di HHV 6-DNA in pazienti affetti da SM ed altre malattie demielinizzanti. **PAZIENTI E METODI.** E' stata studiata una coorte di 148 soggetti. 52 erano affetti da SM, 24 da malattie infiammatorie del sistema nervoso (MISN), 20 da malattie non infiammatorie del sistema nervoso (MNISN) ed, infine, 52 erano volontari sani (VS). La ricerca del DNA virale è stata eseguita su campioni di liquor e siero mediante nested-PCR, regione amplificata ORF-U31 (HHV-6, AB-ANALITICA, Padova, Italia), sensibilità 10 copie DNA/campione. **RISULTATI:** Il DNA virale risultava assente nel liquor e nel siero dei VS. Relativamente ai campioni di siero, la positività del DNA virale veniva documentata nel 18% dei casi con SM, nel 15% con MISN e nel 5% con MNISN. Il trend di positività a favore delle SM risultava maggiormente evidente dall'analisi dei dati riguardanti il liquor. Infatti, la determinazione molecolare risultava positiva nel 43% dei campioni di liquor dei pazienti con SM, nel 30% con MISN e nel 13% con MNISN ($p=0.07$). In particolare, nei pazienti con SM, il DNA virale veniva evidenziato nel liquor e nel siero nel 38 e 20% dei casi RR rispettivamente, nel 62,5 e 25% di RRS, nel 28,6 e 14,3% di SP, nel 32 e 0% dei PP ed, infine, nel 50 e 0% dei NORB. Analizzando insieme i 72 casi con SM ed MISN, una maggiore percentuale di DNA-HHV6 positività, sebbene non significativa ($p=0.082$), è stata rilevata nei sieri, ma non nel liquor, dei casi in fase acuta di malattia. Infine, analizzando lo stesso gruppo di pazienti, il 27,6% dei casi PCR positivi presentava lesioni attive alla risonanza magnetica ($p=0.02$).

CONCLUSIONE. Il presente studio suggerisce un possibile ruolo etiopatogenetico dell'HHV-6 nelle malattie demielinizzanti suggerendo un valido razionale per possibili applicazioni terapeutiche.

DISTINTE SOTTOPOPOLAZIONI DI CELLULE NATURAL KILLER CONTRIBUISCONO IN MANIERA DIFFERENZIALE ALLA RISPOSTA VERSO MYCOBACTERIUM BOVIS, BACILLO DI CALMETTE E GUÉRIN (BCG) NELL'UOMO

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

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

Le cellule NK umane rappresentano approssimativamente il 10% dei linfociti del sangue periferico e sono definite fenotipicamente dalla presenza della molecola di superficie CD56 e dalla mancanza del CD3. Sulla base della densità del marker di superficie CD56 si possono distinguere due principali sottopopolazioni di cellule NK nell'uomo. La maggior parte di esse ($\approx 90\%$) esprime il marker CD56 a bassa densità (CD56^{dim}), mentre esprime alti livelli del recettore per l'Fc γ III (CD16); al contrario $\approx 10\%$ delle cellule NK esprime alti livelli di CD56 (CD56^{bright}), mentre manca del tutto o esprime a bassa densità il CD16. Studi recenti indicano che, analogamente alla dicotomia funzionale descritta da tempo per i linfociti T (Th1 e Th2), le due principali sottopopolazioni di cellule NK umane svolgono funzioni effettrici distinte nella risposta immune naturale. Studi precedenti condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che cellule NK umane purificate e stimolate *in vitro* con BCG esprimono alti livelli dei marker di attivazione CD25 e CD69, vanno incontro a proliferazione e producono elevate quantità di IFN- γ . Scopo del presente studio è stato quello di stabilire il contributo delle due diverse sottopopolazioni di cellule NK (CD56^{dim} e CD56^{bright}) nella risposta immune al BCG nell'uomo. La risposta proliferativa dei due subset di cellule NK in seguito alla stimolazione con BCG è stata valutata mediante analisi in citometria a flusso dell'incorporazione della bromodeossiuridina (BdU) nel nucleo delle cellule in divisione e contemporanea analisi dei marker di superficie. Dopo 5 giorni di stimolazione *in vitro* con BCG, il 34,46 \pm 6,13% delle cellule CD56^{bright} ed il 26,80 \pm 5,65% delle cellule CD56^{dim} ($P=0.001$) risultava BdU⁺, rispettivamente. Analogamente l'analisi in citometria a flusso della produzione intracitoplasmatica di IFN- γ ha rivelato che le cellule CD56^{bright} rappresentano la sottopopolazione di cellule NK prevalentemente coinvolta nella produzione di IFN- γ in risposta al BCG (CD56^{bright} 64,58 \pm 8,34%; CD56^{dim} 23,61 \pm 6,63%; $P<0.001$).

Tali risultati indicano che, benché numericamente meno rappresentate nel sangue periferico, le cellule CD56^{bright} possono svolgere un importante ruolo effettore nei meccanismi di difesa aspecifici nei confronti di agenti patogeni come i micobatteri.

DISTRIBUZIONE DEI SIEROTIPI, SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI E CORRELAZIONI GENETICHE DI CEPPI DI *Neisseria meningitidis* ISOLATI IN ITALIA

Cecilia Fazio, Paola Stefanelli, Arianna Neri, Tonino Sofia, Paola Mastrantonio

Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica

Istituto Superiore di Sanità - Roma

Neisseria meningitidis è uno dei principali agenti eziologici di meningite e setticemia. La recente formulazione di un nuovo vaccino coniugato altamente efficace verso i ceppi di *N. meningitidis* di sierogruppo capsulare C ha ulteriormente allarmato le Autorità di Sanità Pubblica dei Paesi Europei ad incrementare la sorveglianza intorno ai fenotipi circolanti ed a monitorare attentamente le caratteristiche degli isolati.

In Italia, l'incidenza media annua di casi di meningite meningococcica negli anni 1999-2001 è stata di 0,4/100.000 abitanti, con un minimo di 0,06/100.000 in Sardegna ed un massimo di 3,22/100.000 nelle province di Trento e Bolzano. Il tasso di mortalità è intorno al 5,2%.

Il 49% dei casi è stato confermato mediante coltura ed il 79% degli isolati è stato inviato al Laboratorio di Riferimento dell'Istituto Superiore di Sanità. Dai dati raccolti è emerso che il 75% dei ceppi è di sierogruppo B, mentre il 24% è di sierogruppo C. Rari ceppi sono stati tipizzati come W135 o Y.

Il sierogruppo C è stato isolato con una frequenza quasi doppia nei casi di setticemia rispetto ai casi di meningite ed i fenotipi più comuni sono: C:2a:P1.5 e C:2b:P1.5.

I meningococchi di sierogruppo B presentano una larga distribuzione di diversi fenotipi, tra cui i principali sono: B:15:P1.7,16; B:15:P1.4; B:4:P1.4; B:4:P1.13; B:14:P1.13; con una frequenza relativa variabile di anno in anno. A differenza degli altri fenotipi, il B:14:P1.13 si è riscontrato esclusivamente nella regione a Nord-Est d'Italia.

Dall'analisi della sensibilità agli antimicrobici più utilizzati, è risultato che il 3% dei meningococchi ha una diminuita sensibilità alla penicillina (penI). In questi ceppi il gene *penA*, codificante per la Penicillin Binding Protein 2, ha mostrato la presenza di blocchi di DNA esogeno derivante da DNA di neisserie commensali: *N. flavescens*, *N. cinerea*, già descritte in passato, e *N. perflava/sicca*, individuata per la prima volta. Poiché la struttura a mosaico di questo gene è ritenuta responsabile della diminuita sensibilità alla penicillina, anche in questo caso l'aumento delle MIC può essere attribuito allo stesso meccanismo. I ceppi studiati non derivano dall'espansione di un particolare clone, ma sembrano aver acquisito il DNA esogeno indipendentemente. Infatti, l'analisi mediante Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism sottolinea l'eterogeneità tra i ceppi penI e quindi l'assenza di correlazioni genotipiche.

EFFETTI DIRETTI DELL'INIBITORE DELLE PROTEASI INDINAVIR (IND) SUL FUNGO OPPORTUNISTA PATOGENO *Cryptococcus neoformans*

Blasi¹ E., Colombari¹ B., Neglia¹ R., Cossarizza² A., Mussini³ C.

¹Dip. Scienze Igienistiche, Microbiologiche e Biostatistiche, Università di Modena e Reggio Emilia; ²Dip. Sc. Biomediche, Università di Modena e Reggio Emilia; ³Azienda Policlinico di Modena.

BASE: La criptococcosi rappresenta una delle patologie opportunistiche più difficili da trattare del paziente immunodepresso, per la facilità con cui tende a recidivare specialmente nella forma di meningoencefalite. La terapia antiretrovirale a base di inibitori delle proteasi (PI), da tempo ormai impiegata nelle infezioni da HIV, si è rivelata molto efficace sia nel contenere la replicazione virale, che nel rallentare la progressione della malattia da immunodeficienza acquisita. In particolare, studi osservazionali hanno riportato un declino nella incidenza di alcune infezioni opportunistiche, inclusa la criptococcosi, e questo è almeno in parte riconducibile al parziale recupero numerico e funzionale dei sistemi di difesa immunitari dell'ospite. Recentemente, è stata dimostrata una diretta attività microbica nei riguardi di *Candida albicans* di due PI comunemente impiegati nei pazienti HIV positivi, indinavir e ritonavir.

SCOPO: valutare in vitro l'effetto di indinavir (IND) su cellule di *Cryptococcus neoformans* da isolati clinici e non.

METODI: ceppi da collezione ed isolati clinici sono stati esposti a IND a diversi tempi e varie dosi e quindi saggiati per vitalità, attività mitocondriale, capacità proliferativa, suscettibilità a fagocitosi e killing da parte di immunoeffettori cerebrali murini in linea continua (cellule BV2).

RISULTATI: si è dimostrato che IND significativamente riduce l'attività replicativa del patogeno, l'effetto è tempo- e dose-dipendente e sovrapponibile a quanto osservato impiegando pepstatina come controllo positivo; si è osservato inoltre che la pre-esposizione di cellule di *C. neoformans* a IND causa un aumento della loro suscettibilità al killing da parte delle cellule di microglia.

CONCLUSIONE: questo studio fornisce la prima evidenza in vitro circa l'efficacia di IND come agente a diretta attività anti-criptococcica, da cui è possibile ipotizzare un suo ruolo terapeutico in vivo.

Studio in parte supportato dal Progetto Nazionale Ricerca AIDS 2000, contratto n.50D22.

EFFETTO DEL PEPTIDE INTESTINALE VASOATTIVO (VIP) SU MONOCITI UMANI E SU CELLULE INTESTINALI STIMOLATE CON LPS E PORINE DI *SALMONELLA ENTERICA SEROVAR TYPHIMURIUM*

I. Paoletti, N. Canozo, E. Buommino, P. Del Prete, M.A. Tufano

DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE, SEZIONE DI MICROBIOLOGIA E MICROBIOLOGIA CLINICA- SECONDA UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI.

Il VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) è un neuro-polipeptide di 28 amminoacidi, distribuito nel sistema nervoso centrale e periferico e nelle cellule endocrine, dove svolge ruoli di ormone, neurotrasmettitore e immunomodulatore. Interagisce con due tipi di recettori, il VIP₁R, che stimola il sistema adenilato ciclasi e il VIP₂R, accoppiato ai canali del calcio e del cloro. L'obiettivo della ricerca è verificare se nelle infezioni da *Salmonella* il VIP rappresenta un target farmacologico. A tale scopo è stato analizzato l'effetto del VIP sulla espressione di citochine, indotte dai componenti strutturali di *Salmonella enterica serovar typhimurium* quali LPS e porine in monociti umani isolati dal sangue periferico e cellule intestinali (HT29). I livelli di mRNA di TNF- α , IL-6, IL-10, TGF- β , VIP₁R e VIP₂R sono stati analizzati mediante RT-PCR semiquantitativa. I dati ottenuti indicano che in monociti umani, il VIP determina una diminuzione dell'espressione di TNF- α , un'inibizione dell'espressione di IL-6 indotta sia da porine che da LPS, un aumento dell'espressione di IL-10 indotta dai componenti batterici di superficie dopo 4 h di costimolazione e una riduzione dell'espressione di TGF- β dopo 8h di costimolazione con LPS e porine. In cellule intestinali HT29 il VIP non modula l'espressione delle citochine ma induce una riduzione dell'espressione del gene iNOS indotto da LPS. Inoltre i nostri risultati suggeriscono che il VIP interagisce con il recettore VIP₁R sia nei monociti del sangue periferico che nelle cellule intestinali.

Noi proponiamo che durante una normale risposta immune nei confronti di *Salmonella* e dei suoi componenti strutturali la produzione e rilascio di VIP in seguito a stimolazione antigenica possa down regolare una eccessiva risposta immune, che potrebbe essere deleteria per l'ospite, soprattutto attraverso la modulazione di citochine. E' ipotizzabile che, in corso di sepsi da Gram-negativi, il VIP attenui il danno tessutale, inibendo la produzione di agenti pro-infiammatori, e stimolando la produzione di citochine anti-infiammatorie in monociti attivati.

EFFETTO DI ANTIMALARICI SULLA INVASIVITA' BATTERICA E SULLA REPLICAZIONE VIRALE

Rita Greco, Federica Corrado, Giovanna Donnarumma, Elena Grimaldi, Maria Antonietta Tufano

SECONDA UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI - DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE, SEZIONE DI MICROBIOLOGIA E MICROBIOLOGIA CLINICA

I farmaci antimalarici, sebbene utilizzati in maniera primaria nel trattamento contro la malaria, sono utilizzati anche in numerosi disturbi dermatologici, immunologici e reumatologici. Nel corso degli anni numerosi studi hanno attribuito a tali farmaci proprietà antivirali ed antibatteriche, ma anche la capacità di alterare la risposta immunitaria e favorire la formazione di neoplasie causate dai virus come il Sarcoma di Kaposi ed il Linfoma di Burkitt.

Lo scopo di tale studio è stato investigare *in vitro* l'effetto del Chinino Solfato (QS) sull'invasività di ceppi batterici Gram positivi e negativi in cellule HeLa; inoltre, è stato valutato l'effetto di tale farmaco sull'adsorbimento e la replicazione di Herpes Virus tipo 1 (HSV1).

Cellule epiteliali di carcinoma di cervice uterina (HeLa) sono state infettate con ceppi di *E. coli* HB101 pRI203, *S. pyogenes*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, e quindi incubate a 37°C per 2h in presenza o meno di QS, a varie concentrazioni; in altri esperimenti le cellule sono state pretrattate con QS per 1h e poi infettate con i batteri. I controlli eseguiti con QS non evidenziano né attività battericida né citotossica.

Per valutare l'effetto dell'antimalarico sulla infezione virale, cellule epiteliali di rene di scimmia (VERO) sono state infettate con varie diluizioni di HSV-1, sia prima dell'adsorbimento che dopo, in presenza o meno di QS, a varie concentrazioni; le cellule infettate sono state incubate a 37°C per 72h al fine di effettuare la conta delle placche di lisi.

I risultati ottenuti mostrano una modulazione da parte del farmaco antimalarico sull'invasività batterica. In particolare, si osserva un'evidente riduzione dell'invasività di *E. coli* HB101 pRI203 in presenza di QS alla concentrazione di 50 e 100 µM.

Il numero e le dimensioni delle placche di lisi delle cellule VERO infettate con HSV-1 suggeriscono un effetto dell'antimalarico, alla concentrazione di 1 e 10 µM, sulla riduzione dell'adsorbimento e della moltiplicazione virale, sia con un trattamento pre-adsorbimento che post adsorbimento.

Questi risultati indicano che tali sostanze potrebbero avere un ruolo, non solo nelle patologie per le quali sono prescritte, ma anche per il controllo di eventuali sovrainfezioni virali o batteriche che possono instaurarsi.

EFFICACIA MICROBIOLOGICA DELLA FLURITROMICINA NEL TRATTAMENTO DELLA PARODONTITE DELL'ADULTO.

I. Milazzo*°, G. Blandino°, A. M. Lo Bue°, R. Di Marco°, G. Cali°°, B. Rossetti°°, G. Nicoletti°.

° Dipartimento di Scienze microbiologiche e Ginecologiche, Università di Catania.

°° Dipartimento Specialità Mediche Chirurgiche - Sez. Parodontologia, Università di Catania.

Scopo del presente studio è stato quello di valutare l'efficacia della fluritromicina nell'eradicazione dei principali patogeni della parodontite dell'adulto.

In 20 pazienti (età media 43.6 ± 8.1) venivano selezionati in totale 80 siti in base alla profondità di tasca (> 4 mm), (profondità media di tasca dei siti analizzati 6.09 ± 1.15 mm), all'indice di placca e all'indice di sanguinamento: 40 siti venivano trattati con scaling e levigatura radicolare (SRP) (Gruppo A); dopo 15 giorni altri 40 siti venivano trattati con SRP più fluritromicina (375mg/12h/5die) (Gruppo B). Nei due gruppi prima e dopo il trattamento veniva valutata la profondità della tasca. I campioni di placca prelevati da tutti i siti prima e dopo i due trattamenti venivano sottoposti ad analisi batteriologica mediante tecniche standardizzate. Per l'analisi statistica è stato utilizzato il test del χ^2 , e per il confronto tra i due gruppi, il test t di Student ed il test di Wilcoxon per dati appaiati.

La riduzione della profondità di tasca è il parametro da noi considerato per valutare l'effetto clinico dell'eradicazione di specifici patogeni parodontopatici.

I risultati microbiologici mostrano che entrambi i trattamenti determinano una riduzione della prevalenza di *Porphyromonas gingivalis* (SRP da 62,5 a 20% e SRP più fluritromicina da 65 a 5%); inoltre sono in grado di eradicare da tutti i siti *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus* e *Prevotella melaninogenica*. La prevalenza di *Peptostreptococcus* sp. incrementa dopo entrambi i trattamenti, *F. nucleatum* dopo SRP e *A. viscosus* dopo SRP più fluritromicina. Il trattamento effettuato con SRP più fluritromicina è più efficace di quello effettuato soltanto con SRP nell'eradicazione di *P. gingivalis* (24/26 vs 17/25 siti; $P < 0.05$) e *Fusobacterium nucleatum* (8/12 vs 0/9 siti; $P < 0.01$).

Inoltre i risultati mostrano che la diminuzione di queste specie patogene è accompagnata all'incremento in prevalenza di specie potenzialmente benefiche quali *Peptostreptococcus* sp. ed *A. viscosus*. Analizzando i risultati dei siti in cui questi batteri sono isolati è evidente che essi dopo i trattamenti prendono il posto di patogeni parodontali quali *P. gingivalis*, *Prevotella* sp., *B. forsythus* e dopo SRP più fluritromicina di *F. nucleatum*.

I risultati dello studio mostrano che il supporto antibiotico effettuato con fluritromicina al trattamento di scaling e levigatura radicolare, può facilitare l'eradicazione da siti attivi della componente batterica potenzialmente parodontopatogena.

ELEMENTI NEMIS E CONTROLLO POST-TRASCRIZIONALE DELLA ESPRESSIONE GENICA IN *NEISSERIA MENINGITIDIS*

Eliana De Gregorio, Chiara Abrescia e Pier Paolo Di Nocera
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare
Università degli Studi di Napoli Federico II, Via S. Pansini 5, 80131 Napoli
dinocera@cds.unina.it

Il 2% del genoma di *Neisseria meningitidis* (Nm, meningococco) è costituito da piccole sequenze di DNA (70-160 bp) note come elementi Correia o *nemis* (*Neisseria Miniature Insertion Sequences*). I *Nemis* presentano lunghe ripetizioni invertite terminali (TIRs) di 26-27 bp, e sono frequentemente inseriti immediatamente a monte o a valle di geni cellulari. Saggi di *primer extension in vivo* (1) e di *processing in vitro* (2) con estratti cellulari totali hanno permesso di stabilire che le sequenze *nemis* sono co-trascritte con geni cellulari e processate, a livello di strutture a forcina formate dai TIRs, dalla ribonucleasi (RNasi) III. Utilizzando l'enzima di *Nm* over-espresso *in vitro*, abbiamo dimostato che la RNasi III è sufficiente per il processamento dei trascritti *nemis*+. L'impiego come substrati di mini-trascritti *nemis* che variano per la sequenza dei TIRs permette di stabilire che specifiche sotto-famiglie di elementi *nemis* sono resistenti al taglio della RNasi III, e esperimenti di *RNAse protection* confermano l'esistenza di trascritti cellulari *nemis*+ non processati *in vivo*. L'ipotesi che i *nemis* hanno un ruolo nella speciazione e nella patogenicità del meningococco è suffragata da analisi genomiche condotte su 58 geni fiancheggiati da *nemis* nei ceppi sequenziati di Nm Z2491 e MC58. Comparando ceppi di *Nm* geneticamente distanti e ceppi della specie apatogena *N. lactamica*, abbiamo verificato, mediante analisi di PCR, Southern e sequenza nucleotidica che buona parte dei geni in esame sono *nemis*+ solo nel genoma dei meningococchi. Dei geni analizzati, sette codificano per fattori trascrizionali, e una decina per proteine coinvolte nella patogenicità del meningococco. Analisi comparative mirate di RNA in ceppi "pieni" e "vuoti" sono in corso per stabilire correlazioni dirette tra processamento di sequenze *nemis* e livelli di espressione genica.

1. Whole-genome organization and functional properties of miniature DNA insertion sequences conserved in pathogenic *Neisseriae*
Mazzone M., De Gregorio E., Lavitola A., Pagliarulo C., Alifano P., Di Nocera P.P.
GENE (2001) 278, 211-222.
2. The abundant class of *nemis* repeats provides RNA substrates for ribonuclease III in *Neisseriae*
De Gregorio E., Abrescia C., Carlomagno M.S., Di Nocera P.P. e, *BBA* (2002) 1576, 39-44.

EPIDEMIOLOGIA DEL GENE *ERMTR* IN SICILIA NEGLI ANNI 1994 - 2000

P. M. Furneri¹, P. Di Pietro¹, G. Tempera¹, V. M. Nicolosi¹, G. Rappazzo², G. Bisignano³

¹Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche e ²Dipartimento di Biologia Animale, Università di Catania

³Dipartimento Farmacobiologico Università di Messina

Negli ultimi decenni sono stati isolati e caratterizzati circa 30 geni *Erm* (*erythromycin resistance methylase*) provenienti da varie fonti. La sequenza di alcuni di questi geni e delle relative regioni di regolazione devono ancora essere determinati. Le modificazioni post-trascrizionali operate dalla metilasi provocano una diminuzione dell'affinità degli antibiotici appartenenti alla super famiglia *MLS* per la subunità 50 S. Tale super famiglia include Macrolidi, Lincosamidi e Streptogamine, antibiotici che, sebbene chimicamente distinti, si ritiene abbiano siti d'azione sovrapposti.

Il più recente di questi geni è l'*ermTR* isolato descritto da Seppala et Al. nel 1998.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello studiare la circolazione epidemiologica del gene *ermTR* in paragone al gene *ermAM* in ceppi di *Streptococcus pyogenes* isolati nel periodo 1994 - 2000. Per tale scopo sono stati studiati 290 ceppi di *S. pyogenes* eritromicina resistenti appartenenti alle collezioni del Dipartimento Farmacobiologico dell'Università di Messina e del Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche dell'Università di Catania. Per tutti i ceppi in esame è stato determinato il fenotipo di resistenza; tutti ceppi con fenotipo inducibile o costitutivo sono stati sottoposti ad analisi genotipica mediante PCR. Il gene *ermTR* è stato riscontrato nei ceppi isolati nel 1994-1999 (numero degli isolati:230), ma non nei ceppi isolati nel 2000 (numero degli isolati:60). Il gene *ermAM* è stato riscontrato molto più frequentemente del gene *ermTR*.

EPIDEMIOLOGIA DELLE INFEZIONI IN PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA: DATI SICILIANI

Antonella Agodi¹, Martina Barchitta¹, Maria Lucia Furnari³, Lisa Termini³, Tiziana Pensabene³ e Stefania Stefani²

1 - Dipartimento Scienze Biomediche, 2 e Dipartimento di Scienze Microbiologiche – Università di Catania

3 - Centro Regionale Fibrosi Cistica Ospedale dei Bambini “G. Di Cristina” – ARNAS – Palermo

I dati microbiologici internazionali sulla fibrosi cistica, la più frequente malattia genetica a prognosi infausta della popolazione caucasica, vengono raccolti dal 1994 in un registro nord-americano (Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis, ESCF) e in un registro europeo (Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis, ERCF) (Delaisi et al., 1998). Il nostro studio è stato condotto allo scopo di comparare i dati provenienti dal Centro Fibrosi Cistica dell’Ospedale G. Di Cristina di Palermo con quelli dell’ERCF, per identificare eventuali caratteristiche specifiche nell’epidemiologia della fibrosi cistica (FC) in Sicilia. Sono stati studiati 207 pazienti (49.8% maschi e 50.2% femmine) affetti da FC assistiti presso il Centro di Palermo al 31.12.01. I dati raccolti sono stati elaborati con il software SPSS 11.0. I pazienti con FC hanno un’età media di 16.5 anni, più elevata rispetto ai pazienti europei (14.6 anni) e francesi (12.6 anni); sono stati geneticamente studiati in percentuale maggiore (95% contro 75%), ed in minor numero risultano omozigoti per la mutazione $\Delta F508$ (il 27.5% contro il 49% dei francesi e il 77% dei danesi). Si evidenziano le seguenti caratteristiche microbiologiche: i) la prevalenza di isolamento di *Staphylococcus aureus* è inferiore nel centro di Palermo (29%) rispetto a quella registrata in Francia (65%) e in Europa (48%) analogamente ai risultati ottenuti per *Pseudomonas aeruginosa* (46% a Palermo, 56% in Francia e 60% in Europa); ii) a Palermo si è registrata una maggiore frequenza di isolamento di *Burkholderia cepacia*, 21% rispetto al 4% in Francia e al 5% in Europa. Da una analisi dettagliata dei pazienti con *B. cepacia* risulta che il 30.2% sono deceduti; il 25.6% è omozigote per la mutazione $\Delta F508$; il 14% è stato colonizzato anche da *P. aeruginosa*. Il 56% dei ceppi di *B. cepacia* sono del genomovar III, e il 46.5% è il “ceppo epidemico siciliano” (Agodi et al., 2001). La mortalità dei pazienti palermitani nel triennio 1999-2002 è pari al 6.3%; di questi, l’85% era portatore della mutazione $\Delta F508$ e tutti erano colonizzati in maniera cronica da *B. cepacia* (il 69.2% erano ceppi di genomovar III e il 61.5% rappresentavano il “ceppo epidemico siciliano”). Raggruppando i pazienti in base all’età mediana (15 anni), risulta che il 28% di quelli con età superiore è colonizzato in maniera cronica da *B. cepacia*, contro il 14% di quelli con età inferiore. Per quanto si possa ipotizzare un’associazione tra colonizzazione da *B. cepacia* e status genetico dei pazienti (OR: 1.6), in realtà la bassa percentuale di omozigoti $\Delta F508$ indicherebbe che l’elevata prevalenza del microrganismo nei pazienti FC a Palermo sia da attribuirsi alla diffusione epidemica piuttosto che alle caratteristiche intrinseche dei pazienti.

ESPRESSIONE DI UN ANTICORPO RICOMBINANTE SULLA SUPERFICIE DELLO *STREPTOCOCCUS GORDONII*

Giomarelli B.¹, Younson J.², Maggi T.¹, Kelly C.², Pozzi G.¹

¹ L.A.M.M.B. Dipartimento di Biologia Molecolare, Università di Siena, Siena, Italia.

² Immunology Unit, Department of Oral Medicine and Pathology, Guy’s Hospital, London.

I batteri commensali che colonizzano stabilmente le superfici mucose possono essere ingegnerizzati per la produzione di proteine eterologhe e costituire un utile mezzo per il *delivery* di tali molecole alle superfici mucose.

Utilizzando un sistema genetico per l’espressione di proteine eterologhe messo a punto nel nostro laboratorio, è stato espresso sulla superficie di *Streptococcus gordonii*, commensale del cavo orale umano, un anticorpo ricombinante scFv (*single chain variable domain fragment*). Tale scFv deriva da un anticorpo monoclonale (Guy’s 13) diretto contro l’adesina di superficie SA I/II dello *Streptococcus mutans*, la cui colonizzazione della superficie dentale costituisce il fattore primario per l’inizio della carie. Studi precedenti hanno dimostrato che applicazioni topiche del Guy’s 13 prevengono la colonizzazione orale dello *S. mutans* nell’uomo e conferiscono protezione contro la carie dentale in modelli animali.

L’scFv-Guy’s 13 è stato espresso in *S. gordonii* come proteina di fusione con la proteina streptococcica M6 e l’espressione della proteina ricombinante sulla superficie batterica è stata verificata sia mediante Western blot delle frazioni cellulari, sia mediante analisi citofluorimetrica. L’attività di legame della proteina ricombinante è stata analizzata tramite “surface plasmon resonance”, immobilizzando l’adesina di *S. mutans* sulla superficie del “sensorchip”. Le cellule batteriche esprimenti l’scFv si legavano all’adesina con un legame dose-dipendente e tale legame era inibito dalla presenza dell’adesina nella fase fluida.

Questi dati mostrano che l’anticorpo scFv-Guy’s 13 è stato espresso in *S. gordonii* in forma biologicamente attiva. Il ceppo ricombinante esprimente l’scFv potrebbe costituire un utile mezzo per la prevenzione della colonizzazione di *S. mutans* e tale approccio potrebbe essere applicabile al *delivery* di altri scFv alle superfici mucose.

ESPRESSIONE DIFFERENZIALE DEL GENE *GDHA* IN ISOLATI CLINICI DI *NEISSERIA MENINGITIDIS*

R. Colicchio¹, C. Pagliarulo¹, M. Bardaro¹, P. Salvatore¹, A.M. Colucci², C. Monaco², L.R. DeVitis², A. Lavitola¹, C.B. Bruni¹ e P. Alifano²

1) Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano", Università degli Studi di Napoli "Federico II";

2) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche e Ambientali, Università degli Studi di Lecce.

In questo lavoro è stato sviluppato un programma di screening sistematico allo scopo di identificare geni differenzialmente o selettivamente espressi in isolati clinici di *N. meningitidis*. Sono stati isolati geni o sequenze geniche parziali, la cui caratterizzazione è tuttora in corso. Il gene *gdhA* codificante l'enzima glutammato deidrogenasi (GDH) ha mostrato un'espressione differenziale in ceppi virulenti (isolati da malati) e non virulenti (isolati da portatori sani). In particolare, esperimenti di Northern blot hanno dimostrato una sovra-espressione di *gdhA* in ceppi iper-virulenti appartenenti alle linee ET-5 (di sierogruppo B) e IV-1 (di sierogruppo A). La GDH è responsabile della sintesi NADPH dipendente del glutammato a partire da α -chetoglutarato e ammonio. E' uno dei due sistemi enzimatici capaci di assimilare l'ammonio in glutammato; l'altro sistema, la glutammato sintetasi (GOGAT) utilizza la glutammina al posto dell'ammonio, e, pertanto, funziona in maniera accoppiata alla glutammina sintetasi, l'enzima responsabile dell'assimilazione ATP-dipendente dell'ammonio nella glutammina. Il glutammato svolge due ruoli importanti: è la sorgente dell'85% dell'azoto presente nelle molecole organiche (α -ammino-gruppi per la sintesi di purine, pirimidine e amminoacidi), e gioca un ruolo importante nella osmoprotezione. Nelle *Enterobacteriaceae*, *gdhA* è sotto il controllo di diversi circuiti di regolazione; tra questi, quello meglio caratterizzato è controllato dal regolatore NAC, che reprime la trascrizione del gene *gdhA* in *Klebsiella* e in *Escherichia coli* in mezzi poveri di ammonio. A sua volta NAC è sotto il controllo del sistema di regolazione globale *Ntr*. Nel genere *Neisseria*, non esistono evidenze sperimentali sulla regolazione di questi sistemi. L'assenza di un fattore sigma-54 in questo genere suggerisce l'esistenza di circuiti alternativi a quelli (*Ntr*) ben caratterizzati nelle *Enterobacteriaceae*. E' interessante notare che *gdhA* costituisce uno dei circa 30 geni necessari per la virulenza nel modello di infezione sperimentale murino. Future ricerche cercheranno di chiarire il meccanismo di espressione differenziale di *gdhA* nei vari ceppi di meningococco, e la rilevanza di questo fenomeno nell'evoluzione della patogenicità di questo batterio.

ESPRESSIONE E VARIABILITÀ GENETICA DELLE ADESINE HMW IN CEPPI NON CAPSULATI DI *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* ISOLATI DA MALATTIE INVASIVE.

Giovanna Renna, Patrizia Spigaglia, Paola Mastrantonio, Marina Cerquetti.

Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Le proteine HMW1 e HMW2 rappresentano le principali adesine di *H. influenzae* non capsulato e costituiscono il target predominante della risposta anticorpale. Le proteine HMW prototipo sono state individuate nel ceppo *H. influenzae* 12, isolato da un caso di otite media. In questo ceppo, i geni *hmw1A* e *hmw2A*, codificanti rispettivamente per le proteine strutturali HMW1 e HMW2, risultano identici nella sequenza dei primi 1259 bp e successivamente divergono. Nella regione divergente sono localizzati i domini adesivi.

Al fine di studiare la diversità fenotipica e genotipica delle proteine HMW in ceppi invasivi di *H. influenzae* non capsulato, sono stati analizzati 38 ceppi positivi per il cluster genico *hmw*. La presenza del cluster è stata individuata mediante PCR, utilizzando primers specifici per la regione conservata dei geni *hmw1A* e *hmw2A*. L'espressione delle proteine HMW è stata valutata mediante Western blotting utilizzando sieri policlonali e monoclonali. Una sequenza di 2115bp, localizzata nella regione divergente dei geni *hmw1A* e *hmw2A* nel ceppo 12, è stata amplificata mediante PCR. Primers specifici, scelti all'interno di questa sequenza, hanno permesso l'individuazione di diversi domini dei geni *hmw1A* e *hmw2A*, inclusa una regione essenziale del sito adesivo. La variabilità di tale regione dei geni *hmw1A* e *hmw2A* è stata studiata mediante analisi PCR-RFLP.

La presenza delle proteine HMW è stata rilevata, mediante Western blotting con siero policlonale, in 29 dei 38 ceppi positivi per il cluster genico *hmw*. Ventisette ceppi sono risultati reattivi utilizzando anticorpi monoclonali. Il pattern prevalente di reattività immunologica, denominato gruppo 5, era caratterizzato dalla presenza di una sola banda proteica con una reattività di tipo HMW2. La sequenza di 2115 bp è stata amplificata in tutti i 38 ceppi analizzati. Trentatré ceppi sono risultati positivi per il gene *hmw1A*, inclusi quelli appartenenti al gruppo 5, mentre tutti i 38 ceppi contenevano il gene *hmw2A*. L'analisi PCR-RFLP dei geni *hmw1A* e *hmw2A* ha evidenziato la presenza di profili differenti.

I nostri risultati suggeriscono un basso livello d'espressione delle proteine HMW1 negli isolati invasivi di *H. influenzae* non capsulato. L'analisi PCR-RFLP sembra indicare la presenza di diverse varianti dei geni *hmw1A* e *hmw2A*.

FATTORI DI VIRULENZA ESPRESSI DA STIPITI DI VIBRIONI ISOLATI DA PRODOTTI ITTICI

Bruscolini F., Vittoria E., Baffone W., Campana R., Citterio B., Falzano L.,* Donelli G.*

Istituto di Scienze Tossicologiche Igienistiche ed Ambientali, Università di Urbino

**Laboratorio di ultrastrutture, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Batteri appartenenti alla famiglia delle Vibrionaceae sono spesso indicati quali possibili fonti di intossicazione alimentare. Da qui la necessità di approfondire le conoscenze sui fattori di virulenza di maggiore rilievo nella patogenesi delle infezioni umane sostenute da questi microrganismi. Lo scopo del presente lavoro è quello di valutare la potenziale patogenicità di ceppi di Vibroni isolati da prodotti ittici. Lo studio delle caratteristiche di virulenza (adesività, citotossicità ed enterotossicità) è stato effettuato in 48 stipiti di *V.alginolyticus*, 8 di *V.parahaemolyticus*, 7 di *V.harveyi*, 2 di *V.vulnificus*, 3 di *V.mediterranei* e 2 di *V.furnissi*. Caratteristiche di adesività e citotossicità saggiate in monostrati cellulari di Caco-2 ed Hep-2, sono state osservate per tutte le specie allo studio, seppure con percentuali variabili, evidenziando anche per i vibroni alofili l'importanza che assume l'adesione nel processo di colonizzazione "in vivo" e la citotossicità nel causare danno alla cellula ospite. Circa l'attività enterotossica, questa è stata saggiata infettando la linea cellulare HeLa e valutando l'accumulo di fluido nell'ansa ileale di ratto (modello RIL). La positività è stata osservata in 5 stipiti di *V.parahaemolyticus* e in 1 ceppo di *V.alginolyticus*. Infine, utilizzando la tecnica RIL, in 1 stipite di *V.parahaemolyticus* è stato studiato il possibile ruolo di Ca^{2+} , CaM e PKC nel processo patogenetico che è alla base dell'accumulo di fluido indotto dai ceppi di *V.parahaemolyticus* TDH- produttori. Sono stati impiegati come modulatori: Ca^{2+} ionoforo; 1-verapamil, un inibitore dei canali del calcio; W-7, un antagonista della calmodulina; PMA, un attivatore della PKC; H-7, un inibitore della PKC. Le variazioni nell'accumulo di fluido indotte dai modulatori non risultano essere statisticamente significative. I dati suggeriscono un approfondimento delle conoscenze sulle proprietà citotossiche ed enterotossiche di questo fattore di virulenza per meglio chiarirne il meccanismo d'azione ed il ruolo nella patogenesi della gastroenterite umana.

FICCM UNA FEDERAZIONE ITALIANA DI COLLEZIONI DI COLTURE MICROBICHE COME SUPPORTO ALLA BIOTECNOLOGIA

P. Mattarelli^a, A. Vaughan^b, Antonio Logrieco^c, Cristina Varesi^d, R. Locci^e

^aBUSCOB: *The Bologna University Scardovi Collection of Bifidobacterium* (biavati@agrsci.unibo.it)

^bDBVPG *Industrial Yeasts collection* (<http://www.agr.unipg.it/dbvpg/home.html>)

^cITEM *Collection of the Institute of Toxins and Mycotoxins from Plant Parasites* (<http://www.item.ba.cnr.it/catalogo.htm>)

^dMUT: *The Mycotheca Universitatis Taurinensis* (<http://www.bioveg.unito.it/mut/index.html>)

^eNCB: *The National Culture Bank* (romano.locci@pldef.uniud.it)

Il ruolo essenziale delle collezioni di colture microbiche (centri di risorse biologiche o biological resource centers) è stato riconosciuto da molti governi da quando la biotecnologia ha orientato molti scienziati ed ingegneri verso i processi svolti da microrganismi, spesso per la prima volta. Solo nei centri di risorse biologiche (BRCs) è possibile trovare le competenze necessarie per rispondere a quesiti riguardanti la manipolazione di colture, su dove trovare ceppi con proprietà particolari, sulla conoscenza di tecniche di preservazione ed identificazione e sulle regole per il deposito di ceppi ai fini brevettuali.

In risposta a queste esigenze, un gruppo di collezioni di colture microbiche italiane ha proposto di stabilire una Federazione Italiana di Collezioni di Colture Microbiche (FICCM) per la implementazione di servizi BRC collettivi che possono essere messi a disposizione in Italia. Questo progetto include 5 collezioni "storiche" con una lunga tradizione di servizio alla comunità scientifica italiana: 1) La Collezione dei Lieviti Industriali (DBVPG) (stabilita nel 1920 a seguito di studi sulla ecologia dei lieviti vinari, poi estesi ad altri habitat); 2) la Mycotheca Universitatis Taurinensis (MUT) (nata nel 1950 da intensivi studi sulla micologia del suolo); 3) il National Culture Bank (NCB) (inaugurato nel 1947 per la raccolta di ceppi di attinomiceti ed altri importanti batteri del suolo); 4) The Bologna University Scardovi Collection of *Bifidobacterium* (BUSCOB) (stabilita nel 1950 ca. che include anche una collezione di *Pseudomonas* e l'unica del genere *Frankia* in Italia) e (5) la Collezione ITEM dell'Istituto di Scienze delle Produzioni alimentari, inaugurata nel 1970 per lo studio di tossine e parassiti delle piante.

FOLLOW UP DELLA CARICA VIRALE DEL BKV NELLE URINE E NEL SIERO DI TRAPIANTATI RENALI MEDIANTE UN PROTOCOLLO DI PCR QUANTITATIVA

Merlino C., Bergallo M., Bollero C., Sinesi F., Negro Ponzi A., Giacchino F*, Cavallo R.

Dip. Sanità Pubblica e Microbiologia, U.O.A.D.U. Virologia, Università degli Studi di Torino

*Dip. di Nefro-Urologia, U.O.A. Nefrologia e Dialisi, Ospedale Civile, Ivrea (Torino)

In numerosi studi il BKV è stato correlato con la nefrite interstiziale nei portatori di trapianto renale, in cui il trattamento immunodepressivo sembra indurre o almeno permettere la riattivazione del virus. Inoltre, sembra che, almeno in parte, questa patologia sia correlata all'uso di nuovi farmaci immunodepressivi. In questi pazienti l'escrezione del virus nelle urine ha un'incidenza del 5-45% e la replicazione massiva del BKV nell'epitelio tubulare risulta nella perdita dell'organo in circa il 3-5% di essi. L'utilità clinica della PCR qualitativa è limitata data la natura ubiquitaria del virus e la sola presenza del DNA virale non può essere considerata indice diagnostico. Nel presente lavoro abbiamo seguito l'andamento dell'infezione da BKV in 15 pazienti portatori di trapianto renale per 6 mesi ad intervalli mensili. Il monitoraggio dell'infezione è stato eseguito quantificando la carica virale nelle urine e nel siero di questi pazienti mediante tecniche di biologia molecolare messe a punto nel nostro laboratorio. Otto su 15 (53,3%) pazienti studiati hanno presentato BKV-DNA quantificabile sia nelle urine che nel siero con andamenti variabili. Per tutta la durata dello studio nessun paziente ha sviluppato nefrite interstiziale. In particolare, 10/15 (66,6%) hanno mantenuto una buona funzionalità renale (creatinina sierica < 2 mg/dl) nonostante che 8/10 (80%) abbiano presentato viruria e/o viremia; 4/15 (26,7%) hanno raggiunto valori di creatinina più elevati, ma 2/4 (50%) non hanno presentato viruria e/o viremia da BKV. Nel paziente rimanente, che ha presentato per tutta la durata dello studio la funzionalità renale più compromessa, l'attivazione dell'infezione da BKV si è verificata solamente dal 5° mese di osservazione. Tutti questi dati non depongono per una correlazione tra la presenza di viruria e/o viremia da BKV e l'evoluzione verso una patologia d'organo. I nostri dati inoltre non sembrano indicare correlazione tra l'uso di nuovi farmaci immunodepressivi e l'infezione da BKV in quanto la percentuale di attivazione dell'infezione nei due gruppi di trattamento risulta sovrapponibile (75% in tacrolimus vs. 71,4% in Ciclosporina A). Per meglio chiarire questi aspetti è comunque necessario seguire l'andamento dell'infezione per un più lungo periodo di tempo e su un elevato numero di pazienti.

FOSFORILAZIONE DELLE TIROSINE PROTEICHE MEDIATA DALLE PORINE DI *SALMONELLA TYPHIMURIUM*, *PASTEURELLA HAEMOLYTICA* E *HAEMOPHYLUS INFLUENZAE* IN CELLULE THP-1

Massimiliano Galdiero¹, Mariateresa Vitiello², Marina D'Isanto², Lucia Peluso², Emiliana Finamore², Marilena Galdiero¹

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Microbiologia e Microbiologia Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Seconda Università degli Studi di Napoli;

²Dipartimento di Patologia Generale, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Seconda Università degli Studi di Napoli

Le vie di trasduzione del segnale coinvolte nei processi immunologici di attivazione cellulare indotta dalle porine non sono ben conosciuti. In questo studio, il nostro principale scopo è la dimostrazione che anche l'attivazione cellulare da porine sia associata con la fosforilazione delle tirosine di proteine specifiche della cellula ospite. Pertanto, abbiamo valutato l'effetto delle porine isolate dalla membrana esterna di *Salmonella typhimurium*, *Pasteurella haemolytica* e *Haemophilus influenzae* sui processi di fosforilazione in monociti umani di linea (THP-1) ed in macrofagi ottenuti da topi LPS-resistenti (C3H/HeJ). La stimolazione con porine alle concentrazioni di 1 e 5 µg/ml ha indotto la comparsa di proteine fosforilate nelle tre frazioni cellulari ottenute. La ricerca di proteine fosforilate è stata effettuata mediante immunoblotting dopo immunoprecipitazione utilizzando anticorpi monoclonali anti-fosfotirosina. La fosforilazione delle tirosine indotta dalle porine risulta evidente già a 3 min, persistendo a 20 min e decrescendo fino a scomparire dopo 2 ore in maniera dose-dipendente. Il trattamento delle cellule con porine ed LPS induceva un pattern di fosforilazione simile nelle tre frazioni cellulari studiate. Nella frazione citoplasmatica, dopo stimolazione con LPS, le bande con peso molecolare di 50-60 kDa risultavano più evidenti; nella frazione citoscheletrica ed in quella citoplasmatica, dopo stimolazione con le porine erano più evidenti rispettivamente bande con peso molecolare di 80 kDa e 250 kDa. La stimolazione con porine dei macrofagi ottenuti da topi C3H/HeJ induceva la fosforilazione di tirosine proteiche che risultava notevolmente ridotta dopo trattamento con LPS. Inoltre, per valutare le vie di fosforilazione attivate dalle porine sono stati utilizzati alcuni inibitori: la staurosporina (inibitore generale delle chinasi), la ginstestina (inibitore delle tirosin-chinasi) e la citocalasina D (inibitore della polimerizzazione dell'actina).

Lo stesso pattern di fosforilazione è stato osservato utilizzando le porine estratte da *P. haemolytica*, *S. typhimurium* ed *H. influenzae*.

GENE THERAPY OF GLIOMAS AND THYROID CANCER: CLINICAL EXPERIENCE AND NEW EXPERIMENTAL APPROACHES

Giorgio Palù¹, Marco Boscaro², Andrea Cavaggioni³, Federico Colombo⁴ - ¹Department of Histology, Microbiology and Medical Biotechnologies and ³Department of Anatomy and Physiology, University of Padova; ²Department of Internal

Medicine, University of Ancona; ⁴Division of Neurosurgery, Vicenza Hospital.

Following our pilot study of combined suicide and cytokine gene therapy in patients with recurrent, end-stage glioblastoma multiforme (GBM), we have recently extended this protocol to include patients with earlier relapses of GBM and patients with anaplastic thyroid carcinoma. Thirteen patients with recurrent GBM and 2 with end-stage anaplastic thyroid carcinoma have been enrolled so far and evaluated for clinical and biological parameters of response. Patients were treated by direct intra-tumor injection of retroviral vector producing cells, expressing thymidine kinase (TK) of HSV-1 and human IL-2, followed by ganciclovir (GCV) administration for 14 days. No adverse effect was documented. Tumor shrinkage was shown in all cases at MRI, even after withdrawal of GCV and an inflammatory infiltrate was demonstrated in tumor biopsies. While more patients are being recruited to assess safety and efficacy of IL-2/TK gene combination, our preliminary results on the immunostimulating effects of the suicide/immunomodulatory gene therapy indicate that this approach may represent an improvement over the conventional strategy based on TK, as the single therapeutic gene.

A new vector system we are developing for subjects with end-stage GBM failing conventional therapies is based on a replication-competent herpesvirus. To validate this system we use both wt and conditionally replicating HSV-1 strains and adult mice that are either susceptible or resistant to neonatal encephalitis. By adopting the nasal route of inoculation we generated a widespread subclinical brain infection. After an initial burst of replication, detectable in the olfactory bulb and in the whole brain, virus remained latent in neuronal cells suggesting that HSV-1 can safely target the brain via the nasal route. When challenged intracerebrally, mice previously infected with nasal inoculum are resistant to a supralethal dose of HSV-1 but not of VSV, a virus taxonomically unrelated to Herpesviridae. The short-term duration of this virus-specific resistance involves immunological and brain-barrier mechanism as demonstrated by immunohistochemistry and by expression of reporter genes. Experiments are ongoing to investigate whether intranasally injected replication-competent HSV-1 strains can behave as selective oncolytic agents for GBM.

GENOTIPI GB DI CYTOMEGALOVIRUS IN SOGGETTI IMMUNOCOMPETENTI ED IMMUNOCOMPROMESSI PALERMITANI.

S. Arista¹, S. De Grazia¹, G. M. Giammanco¹, P. Di Carlo², E. Iannitto³

1. Dipartimento di Igiene e Microbiologia, 2. Istituto di Patologia Infettiva e Virologia, 3. Divisione di Ematologia con Trapianto di Midollo, Università di Palermo.

La glicoproteina B (gB) presente sull'involuppo del Cytomegalovirus (HCMV), sembra svolgere un importante ruolo nel controllo delle infezioni sostenute da tale virus, in quanto altamente immunogena ed in grado di stimolare sia una potente risposta anticorpale neutralizzante che la produzione di linfociti-T citotossici specifici. Sebbene gB sia la più conservata fra le glicoproteine di HCMV, alcune regioni del gene gB sono altamente variabili. Sulla base della sequenza nucleotidica di queste regioni, è stato proposto uno schema di tipizzazione che ha permesso di evidenziare la circolazione di quattro genotipi di HCMV. Ancora oggi non è stata definita una chiara associazione tra tali genotipi e la virulenza dei ceppi, correlabile con un più alto rischio di sviluppare malattia. Maggiori conoscenze al riguardo sarebbero di grande aiuto nell'indirizzare le strategie preventive nei confronti dell'infezione da HCMV.

Allo scopo di valutare la circolazione nella nostra area geografica dei quattro genotipi gB di HCMV, 82 ceppi virali, ottenuti da campioni di sangue o urina di pazienti ospedalizzati a Palermo dal 1998 al 2001, sono stati tipizzati mediante analisi di restrizione del gene codificante per gB, dopo reazione di amplificazione. I ceppi virali, in particolare, sono stati ottenuti da 17 soggetti adulti immunocompetenti con infezione primaria sintomatica, da 42 soggetti immunocompromessi (23 recipienti di trapianto di midollo osseo (TMO), 11 recipienti di trapianto di rene ed 8 pazienti con infezione da HIV) e da 23 neonati con infezione congenita da HCMV.

Una prevalente circolazione di ceppi appartenenti ai tipi gB2 e gB3 è stata riscontrata sia nei soggetti immunocompetenti che nei pazienti immunocompromessi, indipendentemente dalla presenza e dalla gravità della malattia. I risultati ottenuti inducono a ritenere che il riscontro di ceppi con genotipo gB2 e gB3 nei pazienti sintomatici non sia da associare ad una maggiore virulenza di tali genotipi, ma piuttosto rifletta la loro ampia circolazione nella nostra area geografica.

Risultati differenti sono stati ottenuti nel gruppo di neonati con infezione congenita, dai quali sono stati isolati ceppi dei quattro genotipi gB, con prevalenza del genotipo gB1. E' possibile che ceppi con tale specificità abbiano un particolare tropismo per i tessuti placentari, ma ulteriori studi sono necessari per confermare questa ipotesi.

H. PYLORI E ANTIBIOTICO-RESISTENZA: NUOVE PROSPETTIVE

D. Colombrita, L. Bassani*, A. Caruso*, N. Manca

*Cattedra di Microbiologia, Università degli Studi, Brescia**

Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Spedali Civili di Brescia

H. pylori è un microrganismo che in questi ultimi anni ha assunto un ruolo importante nella patogenesi della gastrite cronica, ulcera peptica e carcinoma gastrico. L'eradicazione del microrganismo si basa principalmente sull'associazione di 3 farmaci comprendenti 2 antibiotici scelti fra amoxicillina, claritromicina, metronidazolo, tetraciclina ed un inibitore della pompa protonica. La resistenza a questi antibiotici può portare al fallimento della terapia. Uno studio multicentrico europeo ha evidenziato che non esiste nessuna resistenza in vitro per l'amoxicillina, mentre la resistenza primaria per il metronidazolo varia dal 10 al 50% e quella per la claritromicina varia dal 2 al 10%. Presso l'Istituto di Microbiologia di Brescia abbiamo valutato la sensibilità ai suddetti antibiotici e ad alcuni chinoloni (levofloxacin, ciprofloxacina) su ceppi isolati da biopsie gastriche, provenienti dal centro di endoscopia digestiva degli Spedali Civili di Brescia.

Il metodo da noi utilizzato è stato l'E-test, che permette di valutare la MIC di ciascun antibiotico. I dati ottenuti dimostrano che i ceppi isolati da pazienti non ancora trattati avevano una sensibilità per l'amoxicillina e tetraciclina del 100%, per claritromicina del 92% e per il metronidazolo del 79%. La sensibilità si riduce notevolmente per quei pazienti che non hanno eradicato l'infezione, pur effettuando un primo ciclo terapeutico. Sui ceppi isolati da questi pazienti l'amoxicillina e la tetraciclina risultano sensibili al 100%, la claritromicina al 75% e il metronidazolo al 50%. Su tutti i ceppi isolati da pazienti trattati e non trattati i chinoloni si dimostravano altamente efficaci con una sensibilità del 97% e con MIC molto basse. Queste molecole potrebbero quindi essere utilizzate con successo su quei pazienti che non hanno eradicato alla prima terapia o che in vitro dimostrano resistenza ad uno o più antibiotici.

In conclusione, è stato notato un incremento del numero di pazienti che non riescono ad eradicare e le cause sono da ricercarsi tra una scarsa compliance da parte del paziente, la capacità del batterio di colonizzare distretti inaccessibili al farmaco e la sua resistenza nei confronti di alcuni antibiotici, soprattutto verso il metronidazolo. In questi casi l'utilizzo di un nuovo regime terapeutico con l'inserimento dei chinoloni, che nella nostra esperienza hanno mostrato una elevata sensibilità in vitro, potrebbe aumentare la possibilità di eradicazione.

HELICOBACTER PYLORI: ACCERTAMENTI DIAGNOSTICI E SENSIBILITÀ MICROBICHE IN UNA CASISTICA DI SOGGETTI CON PATOLOGIA GASTRICA .

G. Capra*, G. Giuliana**, E. Morello***, M. Salvato***, C. Calà*, A. Giammanco*

* *Dipartimento di Igiene e Microbiologia, Università di Palermo*

** *Chirurgia Toracica, (Resp, UOC Dr.A. Cusumano). Ente Ospedaliero di Sciacca*

*** *Cattedra di Anatomia ed Istologia Patologica "R", Università di Palermo*

Helicobacter pylori è agente di infezioni gastriche, responsabile di gastrite ed ulcera peptica, associato, con sempre crescente evidenza, all'adenocarcinoma gastrico, al linfoma gastrico non-Hodgkin ed al MALToma ("mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma") gastrico. Pur se intensamente studiati, diversi aspetti relativi alla sua epidemiologia ed al suo effettivo ruolo patogeno rimangono ancora oscuri. Almeno alcuni di tali aspetti potrebbero essere certamente chiariti dalla ricerca e dallo studio sistematico di isolati batterici; questi non sono tuttavia facilmente ottenibili in quanto l'isolamento batterico è a tutto oggi raramente richiesto nella comune pratica diagnostica e clinica.

Noi abbiamo iniziato a raccogliere una casistica di soggetti affetti da varia patologia gastrica, sottoposti ad indagine endoscopica prima e talora dopo trattamento antibiotico, tutti studiati per la presenza di *H. pylori*, oltre che con le più comuni tecniche diagnostiche attualmente in uso, anche con tecniche tradizionali di isolamento colturale e con tecniche di evidenziazione del DNA batterico mediante PCR ("polymerase chain reaction"). Questa casistica, ancorchè limitata (20 soggetti), è stata qui utilizzata per effettuare determinazioni di sensibilità microbica ai farmaci antibatterici e valutazioni comparative dei diversi metodi diagnostici rispetto ad un "gold standard" costituito da un isolamento colturale e da una PCR riscontrati positivi in almeno uno dei due siti di mucosa gastrica esaminati. Gli stipiti isolati (11), saggiati nei confronti degli antibiotici di più comune, o comunque di possibile impiego terapeutico, hanno esibito resistenza solo nei confronti del metronidazolo (54,5 %) e dell'azitromicina (9,1 %). I valori percentuali di sensibilità e specificità dei singoli metodi diagnostici sottoposti a valutazione sono risultati rispettivamente pari a: 84,62 - 100 (coltura da antro), 53,85 - 100 (coltura da fondo), 100-100 (PCR da antro), 92,31-100 (PCR da fondo), 92,31-92,31 (test all'ureasi su prelievo biptico), 100-54,55 (istologia), 100 - 92,31 (ricerca di antigeni batterici nelle feci), 84,62-92,31 (sierologia).

IDENTIFICAZIONE DI BATTERI GRAM-NEGATIVI PARODONTOPATICI MEDIANTE DIAGNOSTICA MOLECOLARE.

A. Mosca, G. Barra-Parisi, A. Abbinante*, A. Nisio**, G. Mazzeo, G. Miragliotta

Sezione di Microbiologia, MIDIM, Università di Bari, *Igienista Dentale, **Medico Specialista in Odontoiatria

La malattia parodontale è eziologicamente associata a ben definite specie batteriche che possono rappresentare un "marker" della lesione parodontale stessa. Le tecniche di biologia molecolare rappresentano un importante supporto diagnostico in quanto i microrganismi coinvolti sono batteri Gram-negativi anaerobi la cui identificazione richiede attrezzature specializzate ed esperienza dell'esaminatore.

In questo lavoro abbiamo iniziato a valutare il test MicroDent (Symbiosis) in grado di identificare mediante sonde DNA specifiche cinque diverse specie parodontogene Gram-negative: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi), *Bacteroides forsythus* (Bf), *Treponema denticola* (Td).

In 6 pazienti con diagnosi di parodontite generalizzata e progressiva sono state selezionate per ciascun soggetto tre tasche con profondità >5mm. Il materiale da esaminare è stato ottenuto inserendo in ciascuna tasca per 10 sec un conetto di carta. Ciascun prelievo è stato ripetuto in doppio. Il primo campione ottenuto è stato utilizzato per il test MicroDent con estrazione del DNA, amplificazione genica ed ibridazione con sonde molecolari specifiche immobilizzate su striscia di nitrocellulosa. Il secondo campione è stato sottoposto ad esame colturale per la ricerca di Aa, Pg e Pi, utilizzando terreni selettivi preridotti. L'identificazione è stata eseguita con tecnica gascromatografica (Microbial Identification System, Hewlett Packard).

I risultati sono esposti in tabella.

Microrganismo Pazienti (n/6) Microdent Esame colturale Aa Assente Assente Pg 4 1 Pi 1 1 Bf 6 ND Td 6 ND Inoltre mediante coltura sono state isolate altre specie di Bacteroidi pigmentati identificate mediante gas cromatografia come *Prevotella denticola*, *Prevotella oris*, *Prevotella loescheii*.

Viene confermata la correlazione tra batteri parodontogeni e lesione parodontale e in particolare la prevalenza di Td e Bf. Appare interessante, soprattutto per questi due microrganismi, la possibilità di rapida identificazione offerta dal MicroDent test rispetto alle difficoltà tecniche dell'esame colturale classico.

IDENTIFICAZIONE DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN FORMAGGI MOLLI

C. Longhi, M.P. Conte, A. Maffeo, M. Penta, G. Petrone, M. Del Bove, L. Seganti

Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, Università «La Sapienza», Roma.

Listeria monocytogenes sopravvive e si moltiplica in un ampio ambito di temperature, ad elevate concentrazioni di sali ed a basso pH, costituendo un rischio potenziale nel latte ed in altri prodotti lattiero-caseari, spesso implicati quali sorgenti di infezione in gravi episodi epidemici di listeriosi. Nonostante il trattamento con il calore durante la lavorazione dei formaggi sia generalmente sufficiente ad inattivare le listerie eventualmente presenti, sono frequenti contaminazioni nelle fasi successive della lavorazione. I dati della letteratura indicano la presenza di *L. monocytogenes* nel 3 % dei formaggi italiani, con una prevalenza di circa il 6% nella mozzarella e di circa il 4 % in vari altri formaggi molli. Occorre poi considerare che in Italia le linee guida per i livelli di tollerabilità di *L. monocytogenes* nel latte e nei derivati del latte indicano che tale patogeno deve essere assente nei formaggi molli. Pertanto, è di fondamentale importanza l'allestimento di procedure alternative al metodo colturale classico, lento ed indaginoso, per l'isolamento rapido e la conferma di *L. monocytogenes* in questi alimenti.

Abbiamo messo a punto una metodica molecolare, rapida e specifica, per l'identificazione di *L. monocytogenes*, basata sulla reazione di amplificazione genica (PCR). Sono stati utilizzati "primers in house" che riconoscono un frammento di 300-bp o 400-bp della regione codificante di *actA*, un gene essenziale per la virulenza e capace di discriminare tra due diversi alleli naturalmente presenti in *L. monocytogenes*, associati con differenze nel potenziale patogeno dei ceppi. Tale procedura è semplice, a basso costo e riconosce il DNA di ceppi di *L. monocytogenes* di origine clinica ed alimentare, mentre non sono stati osservati prodotti amplificati con altri ceppi di *Listeria* spp. saggiati (*L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovi*, *L. grayi/murrayi*). La metodica è stata applicata per rilevare la presenza di cellule di *L. monocytogenes* in formaggi freschi molli italiani (mozzarella, crescenza e ricotta), artificialmente contaminati. La sensibilità del metodo è risultata elevata, poiché questo è in grado di rilevare bassi livelli di *L. monocytogenes* negli omogeneizzati di mozzarella e crescenza (rispettivamente 0.04-0.4 cfu/g e 4 cfu/g) mentre nella ricotta il limite di rilevazione è risultato più elevato (40 cfu/g).

Ricerca finanziata con fondi ENEA (Programmi Fondi Strutturali) e MIUR.

IDENTIFICAZIONE DI *MYCOBACTERIUM AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS* IN BIOPSIE DI PAZIENTI AFFETTI DAL MORBO DI CROHN MEDIANTE IBRIDAZIONE IN SITU.

Mura M., Duprè I., Zanetti S., Tanda F., Lissia A., Fadda G. e L.A Sechi,

Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia Sperimentale e Clinica, Università degli studi di Sassari, Viale S. Pietro 43/B, 07100 Sassari, Italy.

Il morbo di Crohn è una malattia di cui ancora oggi non si conosce l'eziologia. Si tratta di una infiammazione cronica del tratto gastrointestinale, che può portare ad occlusioni intestinale e fistolizzazione, sono spesso necessarie resezioni chirurgiche del tratto intestinale interessato che non portano a guarigione del malato. Daziel nel 1913 aveva notato analogie con il morbo di Johne dei ruminanti causato da *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis*, ma ancora oggi non si hanno prove certe del coinvolgimento di questo batterio. In questo studio si riporta la presenza di ceppi di *M. paratuberculosis* "cell wall deficient" in tessuti di pazienti Crohn conservati in paraffina mediante la tecnica dell'ibridazione in situ con la IS900 usata come sonda. La PCR è risultata positiva nel 10% dei tessuti analizzati mentre la colorazione con Ziehl Neelsen era negativa in tutti i campioni. L'uso di un anticorpo policlonale per rivelare la presenza di *M. paratuberculosis* nei tessuti positivi ha rivelato la presenza di Micobatteri. Questi risultati suggeriscono il possibile uso della tecnica dell'ibridazione in situ nella pratica clinica per confermare la presenza del *M. paratuberculosis* nei tessuti intestinali di pazienti con il morbo di Crohn.

IDENTIFICAZIONE DI NUOVI ANTIGENI DI *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* MEDIANTE UNA LIBRERIA DI CDNA ESPOSTA SUL BATTERIOFAGO LAMBDA

G. Garufi*, C. Lo Passo*, I. Pernice*, C. Biondo**, M. Bombaci**, E. Beghetto[^], O. Minenkova[^], N. Gargano[^], G. Teti**, F. Felici[^]

*Dipartimento di Scienze Microbiologiche, Genetiche e Molecolari, Facoltà di Scienze M.F.N., Università di Messina,

**Dipartimento di Patologia e Microbiologia Sperimentale – Università di Messina-, [^]Kenton Labs, c/o Sigma-Tau, Pomezia, Roma

Cryptococcus neoformans è causa, nell'uomo, di meningo-encefaliti che colpiscono con particolare frequenza pazienti con difetti dell'immunità cellulo-mediata ed è una delle più frequenti cause di morte in pazienti AIDS. E' noto che l'immunità cellulo-mediata gioca un ruolo cruciale nella difesa dell'ospite contro la criptococcosi. Tuttavia molti studi hanno confermato l'importanza dell'immunità umorale, con particolare riguardo al ruolo degli anticorpi diretti contro il polisaccaride capsulare. Pochissimo è noto sull'identità di antigeni proteici in grado di evocare risposte umorali. Tale conoscenza è essenziale per la messa a punto di strategie di immunizzazione attiva (ad esempio mediante vaccini coniugati composti dal polisaccaride capsulare legato a un antigene proteico) o di immunizzazione passiva.

Allo scopo di identificare antigeni proteici di *C. neoformans*, è stata costruita una libreria, in cui i frammenti derivanti dal cDNA del ceppo di *C. neoformans* CAP67 sono stati espressi come proteine di fusione all'estremità N-terminale della proteina D sul capsido del fago lambda. La libreria di cDNA così ottenuta è stata quindi utilizzata in una procedura di selezione per affinità mediante sieri di topi infettati sperimentalmente con il ceppo altamente virulento H66. Questo approccio ha portato alla rapida identificazione di nuove proteine antigeniche che presentano omologia con sequenze nucleotidiche presenti nella banca dati del progetto genoma di *C. neoformans*. In conclusione, le librerie qui descritte, basate su esposizione in fago lambda, si sono dimostrate un mezzo estremamente potente per l'identificazione di antigeni proteici espressi nel corso di infezione. Sono in corso studi per verificare se questi antigeni sono in grado di evocare anticorpi specifici anche in corso di criptococcosi umana e per determinare l'attività protettiva di tali anticorpi.

IDENTIFICAZIONE DI UN PRESUNTO ABC TRASPORTATORE IN *MYCOPLASMA HOMINIS*

M. G. Crispino¹, P. Di Pietro¹, G. Rappazzo², P. M. Furneri

¹Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche e ²Dipartimento di Biologia Animale, Università di Catania

I membri della famiglia degli ABC trasportatori, sono espressi in diversi organismi sia eucarioti che procarioti, ed accoppiano l'idrolisi dell'ATP alla traslocazione di soluti attraverso la membrana. Essi non solo sono responsabili dell'uptake di nutrienti nei batteri, ma sono anche coinvolti in diversi processi, come la trasduzione dei segnali, la secrezione di proteine, la resistenza a farmaci ed antibiotici, la presenza di antigeni di superficie, la patogenicità batterica e la sporulazione. Tutti i membri di questa grande famiglia, possiedono dei motivi altamente conservati (A e B), che formano una tasca per legare l'ATP.

I trasportatori ABC sono suddivisi in tre gruppi: a) importatori batterici (permeasi periplasmiche); b) trasportatori eucariotici; c) esportatori batterici. Il presente studio deriva dall'osservazione sperimentale che alcuni chinoloni hanno un accumulo mediato da un trasporto attivo nei micoplasmi. Infatti l'accumulo della pefloxacin in *Mycoplasma hominis*, subisce un notevole aumento quando avviene subito dopo l'aggiunta di una fonte energetica (arginina). Questo fenomeno dell'aumento di accumulo in presenza di fonti per la produzione di ATP viene bloccato da composti disaccoppianti come CCCP.

Per studiare la presenza di geni che potessero codificare per trasportatori di tipo ABC sono stati ideati dei primer comparando le sequenze geniche di specie filogeneticamente vicine a *M. hominis*, che esprimevano tali trasportatori.

Siamo riusciti ad amplificare un frammento di DNA di circa 4200 bp, che si presume codifichi per un ABC trasportatore. Abbiamo attualmente sequenziato le prime 400 bp. di tale frammento; l'allineamento ottenuto con il programma BLAST, dimostra un certo grado di omologia con la sequenza genica, che codifica per un ABC trasportatore, riscontrati in altri micoplasmi.

IDENTIFICAZIONE E STUDIO DELL'ESPRESSIONE DI PROTEINE ALCALINE EXTRACELLULARI DI *MYCOBACTERIUM BOVIS* BCG

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

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

I filtrati di colture del bacillo tubercolare contengono antigeni di secrezione potenzialmente utili per l'allestimento di un nuovo vaccino antitubercolare e/o per un impiego a scopo diagnostico. Al fine di identificare nuovi antigeni di secrezione del micobatterio, nel presente studio sono state impiegate l'elettroforesi bi-dimensionale e la spettrometria di massa per identificare proteine con un pI alcalino in filtrati di colture di *Mycobacterium bovis* BCG. Complessivamente sono state identificate dodici proteine, tre delle quali non erano state descritte precedentemente. L'analisi della sequenza delle proteine identificate indicava che due di queste sono di natura secretoria. Una di queste proteine è una putativa autolisina mentre l'altra è una proteina di 26 kDa di funzione ignota che contiene un dominio della famiglia NLP/P60. L'espressione delle proteine identificate veniva analizzata comparativamente in filtrati di colture di BCG incubate in bottiglie rotanti o mantenute in condizioni statiche e raccolte in diverse fasi di crescita, ovvero in fase di crescita esponenziale o in fase stazionaria. Di interesse, l'espressione della proteina di 26 kDa era inferiore di circa tre volte nei filtrati delle colture mantenute in condizioni statiche in confronto a quelli ottenuti da colture incubate in bottiglie rotanti. La putativa autolisina, invece, era espressa in quantità elevata nella fase di crescita esponenziale, mentre la sua espressione diminuiva drasticamente nei filtrati delle colture in fase stazionaria, in entrambe le condizioni di crescita.

IDENTIFICAZIONE MEDIANTE

RT-PCR DEL CULICOIDE *C. PULICARIS* COME VETTORE DEL VIRUS DELLA BLUE TONGUE

S. Caracappa, F.Vitale, M.Vitale, A. Torina e A. Guercio.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri"

Il virus della Blue tongue viene trasmesso attraverso la puntura di insetti ematofagi del genere Culicoides ed in particolare nell'area mediterranea il vettore certo è rappresentato, da *C. imicola*. Dopo i primi focolai sono stati applicati anche in Sicilia piani di sorveglianza entomologica con la disposizione di trappole apposite per la cattura dei Culicoides. Gli insetti catturati sono stati classificati per caratteristiche morfologiche nelle varie specie; l'RNA totale è stato estratto e quindi analizzato per RT-PCR con oligo specifici per l'RNA del virus Blue Tongue. Sorprendentemente oltre alla presenza di campioni di *C. imicola* positivi per l'RNA virale, abbiamo riscontrato in analisi ripetute e controllate opportunamente, alcuni campioni positivi anche di *C. pulicaris*.

E' questa la prima evidenza di RNA virale presente in specie diverse dalla *C. imicola* e quindi potenziali vettori per la malattia. Di grande rilevanza è il fatto che in zone della Sicilia che avevano già dato in passato catture di *C. pulicaris* positive si sono verificati recentemente dei focolai di Blue Tongue in un periodo dell'anno in cui la presenza di *C. imicola* è scarsa. Sono state fatte allora alcune catture in PBS per successivo inoculo in linee cellulari suscettibili al virus per tentare l'isolamento virale. Un inoculo di *pulicaris* al primo passaggio cellulare è risultato positivo per RT-PCR.

IDENTIFICAZIONE MEDIANTE MULTIPLEX-PCR DI BATTERI PARODONTOPATOGENI IN CAMPIONI DI PLACCA SUBGENGIVALE

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

Diversi batteri sono oggi riconosciuti come possibili agenti eziologici delle parodontopatie.

Una multiplex-PCR, basata sulla ricerca del gene 16S dell'rRNA ribosomale, è stata usata per la determinazione della prevalenza di *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.), *Bacteroides forsythus* (B.f.), *Campylobacter rectus* (C.r.), *Eikenella corrodens* (E.c.), *Fusobacterium nucleatum* (F.n.), *Porphyromonas gingivalis* (P.g.), *Prevotella intermedia* (P.i.) e *Treponema denticola* (T.d.) nelle diverse forme di malattia parodontale.

Sono stati esaminati 60 campioni subgingivali ottenuti da 60 pazienti (20 con Parodontite Giovanile (Early-Onset Peridontitis, EOP), 20 con Parodontite cronica dell'adulto (Chronic Periodontitis, CP) e 20 soggetti sani) afferenti all'ambulatorio di Clinica Odontoiatrica del Policlinico "A. Gemelli" dell'Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma.

Eseguita l'estrazione degli acidi nucleici, i campioni sono stati analizzati mediante multiplex-PCR per la ricerca simultanea degli 8 batteri. Frammenti di amplificazione specifici di diverso peso molecolare per ciascun microrganismo sono stati rilevati mediante elettroforesi su gel di agarosio. La sensibilità della reazione è stata valutata mediante diluizioni limite di colture dei ceppi di riferimento e delle sequenze amplificate clonate in un opportuno vettore.

E' stata riscontrata una elevata correlazione tra la presenza dei batteri parodontopatogeni e le due diverse forme di malattia parodontale. In particolare, 4 batteri (A. a, E.c., P.g. e P.i.) hanno mostrato una prevalenza significativamente più elevata nei pazienti con EOP e CP rispetto ai soggetti sani. Inoltre, nel 70% dei casi i pazienti con EOP e CP sono risultati positivi per più di 4 batteri contemporaneamente, mentre nei soggetti sani tale percentuale si riduce al 30 %.

In conclusione, i risultati ottenuti mostrano come l'applicazione di una diagnostica molecolare altamente sensibile e specifica renda possibile l'identificazione rapida dei batteri maggiormente coinvolti nelle parodontiti, permettendo una corretta diagnosi eziologica e l'attuazione di una terapia mirata.

IDENTIFICAZIONE PCR DI CEPPI DI *PSEUDOMONAS* BUONI PRODUTTORI DELL'ANTIBIOTICO 2,4-DIACETILFLUOROGLUCINOLO (DAPG), ATTIVI NELLA RIZOSFERA DEL MAIS

Christine Picard, Lillia Masi, Marco Bosco

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Area di Microbiologia Agraria
Università di Bologna, Via Filippo Re, 6 – 40126 Bologna

In natura, le radici delle piante interagiscono con un gran numero di microrganismi diversi e queste interazioni, insieme alle caratteristiche del suolo, sono i principali fattori della crescita delle piante. Tra i microrganismi, alcuni generi batterici stabiliscono interazioni benefiche con le radici delle piante e le proteggono dagli agenti patogeni. Molti ceppi di *Pseudomonas* fluorescenti presentano questa capacità, che deriva dalla produzione di sostanze antagoniste. Tra queste sostanze, l'antibiotico 2,4-diacetilfluoroglucino (DAPG) è uno dei maggiori fattori responsabili del controllo biologico operato da molti *Pseudomonas* verso un ventaglio di malattie di piante agrarie di grande coltura.

Il gene *phlD* è essenziale nella sintesi di DAPG ed è molto conservato tra i diversi ceppi di *Pseudomonas* produttori di questo antibiotico (più di 75% di omologia) (1, 2). Recentemente, alcuni autori hanno confrontato il polimorfismo nella sequenza di *phlD* con il livello di produzione di DAPG dei singoli ceppi (1, 3), ottenendo risultati contraddittori. Una delle ipotesi attualmente allo studio è che il basso numero di ceppi analizzati abbia provocato *bias* al momento del campionamento.

Per verificare ciò, abbiamo confrontato la produzione *in vitro* di DAPG con il polimorfismo del gene *phlD*, in un elevato numero di ceppi di *Pseudomonas* (144) isolati della rizosfera del mais. Tre gruppi statisticamente diversi di ceppi sono stati identificati in base al livello di produzione di DAPG: debole, buono e forte. Il gene *phlD* di 13 ceppi rappresentanti i tre gruppi di produzione di DAPG è stato sequenziato. Le 13 sequenze presentavano tra loro un debolissimo livello di polimorfismo (1%) che, però, è risultato sufficiente per discriminare i gruppi di produzione di DAPG. Inoltre, le sequenze *phlD* di questi 13 ceppi hanno rivelato un sito di restrizione *KspI* solamente nei ceppi "buoni produttori di DAPG". Questo risultato è stato confermato su 144 ceppi, 82 degli quali sono stati identificati come buoni produttori di DAPG tramite entrambi i test, quantificazione biochimica della produzione di DAPG *in vitro* e restrizione del gene *phlD* con l'enzima *KspI*.

(1) Mavrodi *et al.* 2001. *Phytopathology* 91: 35-43.

(2) Picard *et al.* 2000. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 948-955.

(3) Ramette *et al.* 2001. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14: 639-652.

IL BILANCIO FRA ANTICORPI PROTETTIVI ED ANTICORPI INIBITORI DETERMINA L'EFFICACIA DI UN VACCINO SPERIMENTALE ANTICANDIDA

Carla Bromuro, Antonella Torosantucci, Paola Chiani ed Antonio Cassone

Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica — Istituto Superiore di Sanità, Roma

Un vaccino costituito da cellule intere inattivate di *Candida albicans* conferisce una modesta protezione contro un challenge sistemico letale del fungo in modelli murini, pur stimolando intense reattività anticorpali e cellulari contro una varietà di componenti fungini, sia della parete cellulare che citoplasmatici. In particolare, il siero di questi animali, contiene alti livelli di anticorpi contro alcuni ben noti fattori di virulenza del fungo, quali le adesine mannoproteiche della superficie cellulare, ma non trasferisce protezione passiva. Sorprendentemente, lo stesso siero trasferisce un elevato grado di protezione a topi naive dopo semplice assorbimento su cellule intere non inattivate di *C. albicans*. Questo assorbimento rimuove totalmente gli anticorpi anti-mannoproteine lasciando inalterato il livello di anticorpi anti- β glucano degli strati interni della parete cellulare. Che quest'ultimi anticorpi siano, almeno in parte, responsabili della protezione è suggerito dal fatto che un vaccino costituito da cellule fungine deprivate dello strato mannoproteico superficiale e che espongono β -glucano induce un elevato livello di protezione, trasferibile passivamente. Inoltre, questa protezione passiva è abolita dall'assorbimento del siero su particelle di β -glucano altamente purificate, ma non dall'assorbimento su cellule intere. Nel loro complesso, questi dati suggeriscono che la protezione anti-Candida conferita da vaccini cellulari in un modello sistemico di infezione letale dipenda dall'interazione fra anticorpi protettivi e fattori inibitori, probabilmente anch'essi di natura anticorpale. Ipotizziamo che anticorpi anti- β -glucano (protettivi) ed anticorpi anti mannoproteine od alcuni tipi di essi (inibitori) facciano criticamente parte di questa interazione. Sembrerebbe pertanto che, ai fini della protezione anti-Candida, l'assenza di certi anticorpi sia altrettanto importante della presenza di altri anticorpi e delle risposte cellulari.

IL FATTORE CITOTOSSICO NECROTIZZANTE 1 DI ESCHERICHIA COLI STIMOLA SINTESI E SECREZIONE DI CITOCHINE PRO-INFIAMMATORIE IN CELLULE UROEPITELIALI IN COLTURA

L. FALZANO*, S. TRAVAGLIONE*, M.G. QUARANTA*, A. FABBRI*, M. VIORA*, C. FIORENTINI*

* *Laboratorio di Ultrastrutture e* • *Laboratorio di Immunologia, Istituto Superiore di Sanità, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 – 00161 Roma.*

Numerosi ceppi patogeni di *Escherichia coli* associati a infezioni del tratto urinario (UTI) producono una tossina proteica, il Fattore Citotossico Necrotizzante di tipo 1 (CNF1). Tale tossina attiva permanentemente le GTPasi della famiglia Rho, proteine coinvolte principalmente nella regolazione dell'actina citoscheletrica e nella trascrizione (1). In cellule epiteliali, la modificazione delle Rho GTPasi indotta dal CNF1 porta alla formazione di "stress fibers" e all'induzione di un intenso "ruffling" di membrana che attiva la macropinosi, un processo chiave nell'invasione di cellule ospiti da parte di batteri patogeni (2,3). E' opinione corrente che l'interazione tra batteri patogeni e cellule eucariotiche induca una risposta infiammatoria con conseguente produzione di citochine. Per meglio comprendere il ruolo del CNF1 nelle infezioni associate al tratto urinario, abbiamo indagato la capacità della tossina di stimolare la produzione e il rilascio di citochine pro-infiammatorie in cellule T24, una linea cellulare umana derivata da vescica umana. I risultati da noi ottenuti dimostrano che in questo sistema cellulare il CNF1 promuove sia la trascrizione che il rilascio di diverse citochine pro-infiammatorie quali TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-8. Specie attive dell'ossigeno (ROS) vengono attualmente riconosciute come importanti molecole segnale per la produzione di citochine. Il trattamento con CNF1 induce un aumento nella produzione di ROS e tale aumento viene notevolmente ridotto quando le cellule vengono pre-incubate con un anti-ossidante, N-acetil-L-cisteina (NAC). Sia la trascrizione che il rilascio delle citochine vengono inibiti quando le cellule T24 vengono pre-trattate con la NAC indicando un coinvolgimento dei ROS nella risposta infiammatoria in questo sistema cellulare.

I risultati da noi ottenuti sono in accordo con quanto riportato in letteratura dove viene evidenziato un ruolo importante del CNF1 nel determinare l'infezione e promuovere l'infiammazione in modelli sperimentali *in vivo* (4).

References

Flatau *et al.* (1997). *Nature* 387: 729-733.

Falzano *et al.* (1993). *Mol. Microbiol.* 9: 1247-1254.

Fiorentini *et al.* (1997). *J. Biol. Chem.* 272: 19532-19537.

4) Rippere-Lampe *et al.* (2001). *Infect. Immun.* 69: 3954-3964.

IL MATERIALE CAPSULARE DI CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS VIENE INTERNALIZZATO IN MACROFAGI E NEUTROFILI DOVE È DIVERSAMENTE DEGRADATO.

Claudia Monari, Cinzia Retini, Stefano Perito, Anna Vecchiarelli.

Dipartimento di Medicina Sperimentale Sezione di Microbiologia

Università degli Studi di Perugia

La criptococcosi è una malattia provocata da *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*) caratterizzata dall'accumulo nei tessuti di glucuronoxilomannano (GXM) che è il principale costituente della capsula polisaccaridica di *C. neoformans*. E' ormai noto da tempo che GXM interferisce negativamente con le risposte immuni cellulari e umorali ma poco si conosce dell'interazione del GXM con le cellule del sistema immunitario.

In questo studio abbiamo analizzato il legame, l'accumulo e il destino del GXM in monociti/macrofagi e neutrofili. I risultati ottenuti hanno evidenziato che: 1) I neutrofili legano ed internalizzano il GXM in maniera molto più rapida dei monociti 2) I neutrofili degradano rapidamente il GXM; al contrario i monociti presentano un notevole e prolungato accumulo che è ancora evidente dopo una settimana di incubazione 3) l'internalizzazione del GXM nei neutrofili porta ad una diminuita attività antimicrobica ed a una marcata vacuolizzazione. In conclusione i nostri dati evidenziano che neutrofili e macrofagi hanno la capacità di internalizzare il GXM in maniera diversa, in quantità diverse e in tempi diversi, e di degradarlo diversamente. Inoltre l'interferenza negativa del GXM con l'attività antimicrobica dei neutrofili evidenzia un nuovo meccanismo di virulenza innescato da tale materiale.

IL RUOLO DELL'ENZIMA DNA GIRASI NELLA CONIUGAZIONE BATTERICA

S. Roveta, M. Bozzolasco, A. Zoratti, E.A. Debbia, A. Marchese.

Istituto di microbiologia, Università di Genova.

Obiettivi: il ruolo della DNA girasi nella coniugazione batterica è stato studiato utilizzando sia differenti chinoloni sia mutanti termosensibili nelle funzioni *gyrA*, *gyrB*, *dnaA* in esperimenti di coniugazione mediati dal plasmide *Flac*.

Metodi: *E. coli* K12 N4177(*Flac*)*gyrB*(*Ts*), KNK453(*Flac*)*gyrA*(*Ts*) e PC5(*Flac*)*dnaA*(*Ts*) sono stati utilizzati come ceppi donatori. Due ceppi J-53, uno resistente alla rifampicina e l'altro all'acido nalidixico, sono stati impiegati come organismi riceventi.

Successivamente J-53 (*Flac*) rifampicina-resistente e J-53 (*Flac*) acido nalidixico-resistente sono stati utilizzati come ceppi donatori e KNK453, N4177 e PC5 sono stati impiegati come ceppi riceventi.

Le coniugazioni sono state condotte con la metodica standard utilizzando 2×10^8 cell/ml in Mueller-Hinton brodo. Le cellule sono state incubate per 60 minuti a differenti temperature, permissiva e non permissiva (30°C e 43°C rispettivamente) sia in presenza che in assenza di chinolone.

Risultati: Quando i ceppi termosensibili sono stati usati come donatori, in condizioni permissive (30°C) l'acido nalidixico e la moxifloxacina hanno ridotto il numero di ricombinanti fino al 99% rispetto ai controlli incubati senza antibiotico. Quando gli stessi esperimenti sono stati condotti alla temperatura non permissiva (43°C) l'acido nalidixico e la moxifloxacina hanno inibito il trasferimento dell'*Flac* fino al 99% dal mutante *dnaA*(*Ts*) ma non dal *gyrA*(*Ts*) e dal *gyrB*(*Ts*).

Quando i mutanti termosensibili *gyrA* e *gyrB* sono stati usati come ceppi riceventi, il numero dei ricombinanti è risultato inferiore a quello ottenuto con i controlli ma superiore in quantità a quello evidenziato utilizzando i ceppi termosensibili come donatori.

In tutte le condizioni sperimentali la sola inattivazione della temperatura non influiva significativamente sul numero dei ricombinanti.

Conclusioni: Sulla base di queste osservazioni è possibile dedurre che il ruolo della DNA girasi durante il processo di coniugazione appare marginale, in quanto l'inattivazione dell'enzima non influisce sul trasferimento di *Flac*, nello stesso tempo il chinolone alla temperatura non permissiva non è più in grado di legarsi al suo bersaglio e quindi non esplica più il suo meccanismo di inibizione.

IMPATTO DELLA PROTEINE PE_PGRS SULLA MORFOLOGIA DI MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.

Cinzia Pusceddu, Giovanni Delogu, Alessandra Bua, Michael J. Brennan[§], 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 genoma di *Mycobacterium tuberculosis* hanno suggerito importanti ed originali ricerche che hanno consentito di capire aspetti fondamentali della biologia dei micobatteri, 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. Nel nostro lavoro, un gene della famiglia PE (Rv1818c) è stato scelto come prototipo allo scopo di studiare il ruolo delle proteine PE e PE_PGRS nella biologia del bacillo tubercolare, valutando i cambiamenti fenotipici associati con l'over-espressione dello stesso gene o del suo dominio PE. Il gene Rv1818c, e la sua porzione PE, sono stati clonati nel plasmide pMV206, che consente l'espressione del gene in micobatteri, sotto il controllo del promotore costitutivo *hsp60*. I plasmidi ottenuti sono stati utilizzati per trasformare il ceppo mc²155 di *M. smegmatis*, ed il ceppo H37Rv di *M. tuberculosis*. I trasformanti ottenuti hanno dimostrato importanti caratteristiche fenotipiche in terreno di coltura solido. Ad esempio le colonie *M. tuberculosis* che over-esprimono PE_PGRS mostrano un diametro inferiore a quelle del ceppo di *M. tuberculosis* che over-esprime il dominio PE. I trasformanti sono stati analizzati in studi al SEM, allo scopo di analizzare la morfologia della cellula micobatterica. Tali studi hanno evidenziato ulteriormente come l'over-espressione di PE e di PE_PGRS abbia un effetto importante sulla morfologia e struttura della cellula micobatterica. In particolare si è potuto dimostrare che l'over-espressione della regione PGRS ha un impatto sulla morfologia della colonia, interferisce con l'interazione tra batteri, ed ha un effetto sulle dimensioni della cellula. Tali dati supportano l'ipotesi che le proteine PE_PGRS siano localizzate a livello della parete cellulare.

IMPIEGO DI TECNICHE MOLECOLARI PER L'IDENTIFICAZIONE E BIOTIPIZZAZIONE DI POPOLAZIONI MICROBICHE DA PRODUZIONI CASEARIE ARTIGIANALI

Luana Dell'Aquila, Lucia Aquilanti, Anna Lisa Zocchetti, Emanuele Zannini, Francesca Clementi.

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie e Ambientali Facoltà di Agraria Università degli Studi di Ancona Via Brecce Bianche, 60131 Ancona; e-mail: francesca.clementi@unian.it

Le popolazioni microbiche autoctone, responsabili delle fermentazioni naturali, contribuiscono in modo sostanziale al raggiungimento delle caratteristiche compositive e sensoriali di alimenti prodotti artigianalmente.

Lo studio di questi microrganismi è stato condotto, in passato, classificandoli sulla base delle loro caratteristiche fenotipiche. Tuttavia, recentemente, l'analisi delle sequenze del 16S rDNA ha evidenziato incongruenze tra l'identificazione fenotipica e genotipica di batteri lattici isolati da prodotti a fermentazione naturale, rendendo di conseguenza necessario lo sviluppo di metodologie di indagine molecolare.

In questo contesto, il nostro lavoro ha messo in atto un approccio polifasico alla identificazione di colture batteriche isolate dal formaggio DOP Canestrato Pugliese, per la loro classificazione, nell'ottica di un eventuale utilizzo come starter di caseificazione. A tal fine, su 209 isolati, è stata condotta una identificazione fenotipica preliminare con l'esecuzione di 32 test biochimici e relativa *cluster analysis*. Di questi isolati, 121 sono stati sottoposti ad una serie di indagini su base genotipica: PCR-ARDRA per *Lactococcus* ed *Enterococcus*; PCR multipla per *Lactobacillus plantarum*, *Lb. paraplantarum*, e *Lb. pentosus*; PCR specie-specifica per *Lb. brevis*. La diagnosi di specie è stata confermata mediante sequenziamento di una porzione del 16S rDNA. Al fine di individuare la presenza di isolati derivati da uno stesso clone, è stata indagata la biodiversità intraspecifica, mediante biotipizzazione con PCR-RAPD.

I risultati ottenuti hanno consentito in primo luogo di confermare la necessità di un approccio polifasico alla classificazione, mediante una indagine fenotipica preliminare e una combinazione di diverse tecniche su base genotipica.

All'interno della popolazione microbica del Canestrato Pugliese è stata rilevata una elevata frequenza del genere *Enterococcus*, caratteristica comune di molte produzioni casearie artigianali. Fra i batteri lattici sono state individuate principalmente specie mesofile omolattiche, le più frequenti *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* e *Lactobacillus plantarum* e, fra gli eterolattici, *Lb. brevis*.

L'analisi PCR-RAPD è risultata in grado di evidenziare la biodiversità intraspecifica a condizione di utilizzare un set di differenti primer.

IMPIEGO DI TECNICHE MOLECOLARI PER LA CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI DI *BURKHOLDERIA CEPACIA* ISOLATI DA PAZIENTI FIBROCISTICI.

T.Alice, C.Deplano, E.Burdino, S.Bianco e D.Savoia

Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Università di Torino

Cepi di *Burkholderia cepacia* isolati dall'espettorato di pazienti fibrocistici pediatrici ed adulti sottoposti a controlli periodici nel nostro distretto (18 ceppi provenienti da 9 bambini e 19 da 12 adulti) sono stati caratterizzati e confrontati con 7 ceppi di riferimento.

L'identificazione biochimica è stata confermata dalla ricerca del gene 16S rRNA caratteristico della specie. L'analisi mediante PCR del gene *recA* ha permesso di classificare i ceppi in genomovar. Ventitré ceppi sono risultati appartenenti al genomovar III-A, 3 al IV, 3 al VII ed 8 a genomovar diversi.

La ricerca nei batteri di due geni, *cblA* e *BCESM*, correlati, in base ai dati della letteratura, a ceppi ipertrasmissibili, ha evidenziato la presenza del gene *cblA* solo in uno dei ceppi isolati, appartenente al genomovar VII, mentre il gene *BCESM* è stato identificato in 15 ceppi, tutti classificati nel genomovar III-A.

È stata eseguita un'ulteriore tipizzazione di tutti i ceppi disponibili mediante RAPD e PFGE, che ha permesso di differenziare 13 genotipi. Di questi 6 sono relativi ai ceppi di riferimento e 7 sono caratteristici dei ceppi isolati nel nostro distretto (6 dagli adulti e 3 dai bambini, in quanto due genotipi sono risultati presenti in ambedue le categorie di pazienti). Nella maggior parte dei soggetti in cui è stata effettuata un'analisi di campioni prelevati in tempi successivi è stata evidenziata la presenza di ceppi con uno stesso genotipo.

La caratterizzazione di *Burkholderia cepacia* basata su tecniche di tipizzazione molecolare risulta costosa, ma permette di porre le basi per affinare e standardizzare gli studi epidemiologici utili allo sviluppo di strategie di controllo ed approcci terapeutici nei pazienti affetti da fibrosi cistica.

INCIDENZA E SENSIBILITÀ IN VITRO DELLE DIVERSE SPECIE DI CANDIDA ISOLATE IN DONNE SINTOMATICHE DELLA PROVINCIA DI CATANIA.

M.Caccamo, S.Franco, A.Bruno, M.Mirabile, E. Cammarata, *S.Corsello

Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze ginecologiche - Università di Catania;

** Unità di Ost/Ginecol. Presidio Ospedaliero Paternò*

La candidosi vulvovaginale (VVC) rappresenta la più comune patologia a carico delle basse vie genitali nella donna fertile (con una prevalenza del 25% rispetto a tutte le vaginiti) ed in cui la scelta terapeutica è condizionata dalla etiologia.

Il principale responsabile infatti di VVC appartiene alla specie *C. albicans*, anche se A.A. riportano in Italia un aumento di incidenza per specie non-albicans (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*).

Il nostro Dipartimento ha recentemente partecipato ad uno studio epidemiologico nazionale (8 Centri) in cui sono stati arruolate più di 1000 donne con VVC sintomatica confermata microbiologicamente.

L'analisi dei dati relativa alle 248 donne residenti nella provincia di Catania ha dimostrato la netta prevalenza di *C.albicans* che è stata isolata nell'83% dei casi (maggiore della media registrata nello studio globale, 77.1%) seguita da *C. glabrata* (12%; media nazionale:14.6%) mentre le altre specie di *Candida* non-albicans non raggiungevano il 5%.

La prevalenza di ceppi di *Candida albicans* o non-albicans era indipendente da fattori demografici, presenza di fattori di rischio o grado di sintomatologia. Lievi differenze sono state invece riscontrate tra il gruppo con VVC acuta e quello con VVC ricorrente; in quest'ultimo infatti la incidenza di *C.albicans* come reperto monomicrobico o in associazione con *C.krusei* era superiore.

Per quanto attiene alla attività in vitro, i ceppi isolati in corso di candidosi acute hanno presentato buona sensibilità ai tre antimicotici maggiormente utilizzati nella pratica clinica: fluconazolo (86%), itraconazolo e al ketoconazolo (89%) Nelle candidosi ricorrenti, fluconazolo e l'itraconazolo hanno dimostrato attività nell'84% dei casi e ketoconazolo nell' 87.3%.

L'attività del fluconazolo era lievemente superiore nei ceppi di *C.albicans*, mentre in *C.krusei*, nelle candidosi acute è stata riscontrata un'ottima azione del ketoconazolo e buona dell'itraconazolo; nella candidosi ricorrenti è stata riconfermata l'ottima azione del ketoconazolo e la scarsa sensibilità del fluconazolo, mentre itraconazolo nei ceppi derivanti da candidosi ricorrenti ha avuto un'azione minore rispetto a quelli provenienti da candidosi acute.

Nei ceppi di *C. glabrata* isolati sia nelle candidosi acute che in quelle ricorrenti, l'azione del fluconazolo e dell'itraconazolo è nulla, al contrario il ketoconazolo ha avuto un'ottima attività sui ceppi isolati da candidosi acute.

INDAGINE MICROBIOLOGICA SU FILI DI SUTURA IMPIEGATI IN CHIRURGIA ORALE.

A.M. Cuffini, M. Amasio*, C.Gallesio*, V.Tullio, N. Mandras, G. Banche, J. Roana, N.A. Carlone.

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

**Chirurgia Orale, U.O.A.D.U Chirurgia Maxillo-Facciale, S. Giovanni Battista, Torino.*

In chirurgia orale i materiali più comunemente usati per le suture sono fili sintetici di varia natura. Nel presente studio si è proceduto all'analisi microbiologica quantitativa e qualitativa su fili di sutura prelevati, in condizione di asepsi, da pazienti afferenti al reparto di Chirurgia Orale, U.O.A.D.U Chirurgia Maxillo-Facciale, S.Giovanni Battista, Torino.

L'analisi è stata effettuata su 60 campioni di fili di sutura di diversa struttura e composizione quali seta – mersilene – supramid – etybond – ticon – monocryl – vicryl. Per tutti i campioni si è valutata la carica batterica mediante la conta in piastra delle unità formanti colonie (ufc/ml) utilizzando terreni colturali idonei alla crescita dei batteri aerobi ed anaerobi. L'analisi quantitativa e qualitativa di eventuali miceti è stata effettuata con l'impiego di Sabouraud dextrose agar. Dopo un periodo di incubazione di 24 ore per i batteri e 48 ore per i miceti, è stata valutata la crescita batterica e fungina, contemporaneamente all'osservazione macroscopica delle colonie e a quella microscopica previa colorazione di Gram.

Dall'analisi dei dati relativi alle cariche batteriche riscontrate dopo l'incubazione, riferibili al confronto tra i fili di sutura in seta e quelli in ticon, emerge che i fili in seta presentano una carica batterica minore di un ordine di grandezza (10^5 ufc/ml) rispetto a quella dei fili di sutura in ticon. Al contrario, confrontando i dati relativi ai fili di sutura in mersilene – supramid – etybond – vicryl con quelli in seta, non emergono differenze significative. Solo per quanto riguarda il filo di sutura in monocryl, la carica batterica è risultata mediamente inferiore di un ordine di grandezza rispetto a quello del filo in seta. Infine, l'identificazione dei ceppi è stata condotta mediante le metodiche routinarie dell'analisi microbiologica con l'ausilio di opportuni terreni colturali selettivi per le diverse specie isolate e l'utilizzo di kit per l'analisi dei profili biochimici. Nella maggior parte dei casi si è riscontrata una flora polimicrobica, costituita principalmente da bacilli gram-positivi, streptococchi α -emolitici, stafilococchi e in quantità minore, cocchi anaerobi gram-negativi; in un solo caso si è evidenziata la presenza di *Pseudomonas* spp. Per tutti i campioni di filo saggiati non è stata riscontrata crescita di miceti, ad eccezione di un unico isolamento (*Candida* spp.).

INDAGINE DI CORRELAZIONE TRA I CEPPI MDR DI MYCOBACTERIUM BOVIS MEDIANTE AFLP

Vitale F., Reale S., Oliveri F., Vitale M., Caracappa S.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

Sommario

L'AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism) è una tecnica basata sull'amplificazione selettiva di frammenti di restrizione ottenuti da un DNA genomico opportunamente digerito con diversi enzimi. (P.Vos, R.Hogers et altri).

Questo metodo di fingerprinting che combina la tecnologia del DNA ricombinante e della PCR, esalta le differenze nella distribuzione dei siti di restrizione mediante l'amplificazione che rende evidenziabili anche bande poco rappresentate. La scelta di tale tecnica è dettata dall'applicazione specifica che si vuole fare e dal tipo di DNA da studiare. Nel caso dei diversi ceppi di *Mycobacterium bovis* che sono strettamente imparentati, abbiamo ritenuto utile l'applicazione dell'AFLP per la ricerca di eventuali polimorfismi legati alla resistenza agli antibiotici. Questa capacità è dovuta primariamente all'accumulo di vari tipi di mutazioni nei geni che subiscono direttamente o indirettamente, l'azione del farmaco. L'acronimo MDR indica una resistenza multipla almeno alla RIF e all'INH che si manifesta in seguito a vari tipi di mutazioni nei geni target dei farmaci o ad alterazioni della loro espressione. La probabilità di resistenza è più alta nei confronti dei farmaci di seconda scelta nella cura della tubercolosi, ed è proporzionale alla carica batterica. Poiché con l'uso indiscriminato di molecole antibiotiche aumentano le probabilità di acquisizione di resistenze multiple, risulta evidente la necessità di avere a disposizione una tecnologia di caratterizzazione dei ceppi quanto più efficiente possibile per l'individuazione dei ceppi eventualmente isolati nel territorio e per tracciare i possibili flussi di contaminazione. In questo lavoro vengono mostrati i dati preliminari relativi all'analisi per AFLP, di alcuni ceppi con profilo noto di resistenza ad antibiotici. I dati fin qui ottenuti, sebbene solo preliminari, servono a confermare la linea filogenetica tra le specie studiate. L'AFLP sembra essere nel suo complesso la tecnica che da maggiori informazioni ma va ancora sperimentata con diverse coppie di enzimi. E' auspicabile quindi che proseguendo con questo tipo di indagine si possano confrontare i risultati ottenuti con diversi enzimi e adattatori in modo da trovare il sistema che meglio di altri possa discriminare i singoli ceppi.

INDAGINE RETROSPETTIVA SULLE EMOCOLTURE PRESSO I REPARTI DEL POLICLINICO DI CATANIA NEGLI ANNI 2000-2002

P.Grassi,E.Grasso,R.Russo,G.Trapanotto,Alombardo, A.Mazzurco, A Sciacca

Laboratorio Analisi Azienda Policlinico Università Catania

L'emocultura rimane tuttora un esame microbiologico fondamentale per il rilevamento della batteriemia poiché il suo utilizzo permette una corretta impostazione terapeutica della terapia antibiotica. Scopo della nostra indagine è quello di analizzare l'incidenza dei microrganismi identificati nelle emocolture nell'ottica di attuare un programma di sorveglianza epidemiologica. Sono state esaminate le emocolture provenienti dai pazienti ricoverati, da gennaio 2000 a giugno 2002, presso le Cliniche Pediatriche, Chirurgiche Neurologiche e Clinica Medica dell'Azienda Policlinico Università CT. Le indagini sono state eseguite con il sistema automatico Bactec (BD) utilizzando i vari flaconi aerobi e anaerobi., sui campioni risultati positivi sono state eseguite delle subculture. Per l'identificazione e antibiogramma sono stati utilizzate le card VITEK BioMerieux. Di ogni paziente sono state prese in considerazione solo le prime emocolture positive. La flora è stata sempre monomicrobica tranne in quattro casi nella terapia intensiva neonatale. Le percentuali di positività sono aumentate nei tre anni. In oncologia pediatrica su 3480 emocolture le percentuali di positività sono state nel 2000 il 3,3 %, nel 2001 il 6% e nei primi sei mesi del 2002 il 12 %. In terapia intensiva neonatale si è avuta rispettivamente il 6,8%, 14% e 19% su un totale di 777 emocolture. Negli altri reparti non chirurgici si è avuto 3,5%-7,6%-6% di positività su 375 esami effettuati. I reparti di chirurgia con trapianti e uti hanno effettuato 250 esami con l'8,5% 10,7% e il 14 % di positività. In ematologia pediatrica sono stati isolati Stafilococchi coag. neg. (30-35 %) e Gram neg. non fermentanti (51-56%) che presentano le più alte percentuali di isolamento relativamente costanti nei tre anni. In terapia intensiva neonatale si riscontrano soprattutto Stafilococchi coag. neg (33-43%) e *Candida albicans* 55-31%, mentre in tutti gli altri reparti Stafilococchi coag. neg sono stati isolati con % variabili (14 -50). In chirurgia le emocolture effettuate sono di gran lunga inferiori rispetto alle pediatrie ma la percentuale di positività è elevata forse perché questo esame viene effettuata solo in presenza di evidenti segni di sepsi. L'esecuzione dell'emocultura, ci permette di monitorare l'incidenza di infezioni opportunistiche da batteri e lieviti fornendo ai clinici dati aggiornati con la possibilità di utilizzare protocolli terapeutici mirati.

INDUZIONE DEI FATTORI DI TRASCRIZIONE AP-1 ED NF-KB ATTRAVERSO IL PATTERN DI CHINASI RAF-1/MAPK ATTIVATO DALLE PORINE DI *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR TYPHIMURIUM

Massimiliano Galdiero¹, Mariateresa Vitiello², Marina D'Isanto², Annalisa Tortora², Paola Rotondo² e Stefania Galdiero³

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Microbiologia e Microbiologia Clinica, Seconda Università degli Studi di Napoli;

²Dipartimento di Patologia Generale, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Seconda Università degli Studi di Napoli;

³Dipartimento di Chimica Biologica, Centro di Studio di Biocristallografia, Università degli Studi di Napoli Federico II

Le porine, proteine maggiori della membrana esterna dei batteri Gram negativi, sono intimamente associate al lipopolisaccaride (LPS) in essa presente; esse come l'LPS, inducono alcuni effetti biologici tra cui attivazione cellulare e rilascio di citochine. Le cascate Mitogen-activated protein chinasi (MAPK) rappresentano i sistemi più conosciuti di trasduzione del segnale di attivazione intracellulare nel processo di induzione dei fattori di trascrizione.

In questo studio abbiamo esaminato la capacità delle porine di *Salmonella enterica* serovar Typhimurium di attivare i fattori "activating protein 1" (AP-1) e "nuclear factor kB" NF-kB, attraverso la cascata MAPK in cellule U937, identificando le subunità proteiche indotte di AP-1. Il trattamento delle cellule U937 con porine (5 µg/ml) induceva la fosforilazione della chinasi Raf-1 con conseguente fosforilazione della MAPK chinasi 1/2 (MEK1/2), p38, extracellular-signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2) e c-Jun N-terminal kinase (JNK). Per correlare l'attivazione delle protein-chinasi analizzate con l'induzione dei fattori AP-1 ed NF-kB sono stati utilizzati in alcuni esperimenti tre inibitori quali il PD098059, un inibitore selettivo di MEK1 e della cascata MAPK; l'SB203580 un inibitore specifico della p38 e il forskolin un inibitore a livello della Raf-1 chinasi. Il pretrattamento con PD098059 riduceva l'attivazione di AP-1 ed NF-kB mediata dall'LPS, ma non da porine, mentre il pretrattamento con l'SB203580 riduceva l'attivazione di AP-1 ed NF-kB indotta dalle porine suggerendo il coinvolgimento di p38 nella regolazione di AP-1 ed NF-kB porine-dipendente in cellule U937.

L'analisi dei componenti proteici di AP-1 evidenziava nelle U937 non stimolate la comparsa delle subunità JunD e c-Fos. Dopo stimolazione con LPS il complesso AP-1 risultava costituito da JunD, c-Fos e c-Jun mentre solo nelle cellule stimolate con porine si osservava anche la comparsa della proteina Fra-2.

I dati ottenuti delineano per le porine e l'LPS differenti meccanismi molecolari di attivazione cellulare.

INDUZIONE DIFFERENZIALE DI TNF α E IL-18 IN CELLULE MONONUCLEATE DI SANGUE PERIFERICO UMANO INFETTATE CON LEISHMANIA MAJOR O DONOVANI.

D. Iannello, A. Arena, C. Buemi*, M. Calapai, B. Pavone**, G. Stassi, D. Gazzara.

Dipartimento di Discipline Chirurgiche Generali e Speciali, Sezione Microbiologia, Università di Messina, Torre Biologica, Policlinico, Via Consolare Valeria, Messina.

E' ben noto che una complessa rete di citochine è coinvolta nella risposta dell'ospite a numerosi agenti infettivi, tra cui i protozoi appartenenti al genere *Leishmania*. Tuttavia, il ruolo giocato da diverse citochine nelle patologie dovute a diverse specie di *Leishmania* potrebbe non essere univoco. In questo lavoro si è studiata comparativamente la produzione di TNF α e IL-18 da parte di cellule mononucleate ottenute da sangue periferico umano (PBMC) infettate con *L. donovani* o *L. major*. Si è inoltre valutata la produzione degli stessi fattori da parte di monociti ottenuti dagli stessi donatori. Le PBMC infettate con *L. major* producevano quantità di TNF α significativamente più basse rispetto a quelle indotte da *L. donovani* nelle stesse condizioni sperimentali. In particolare, i monociti infettati con *L. donovani* producevano quantità di TNF α non significativamente differenti da quelle prodotte dalle PBMC degli stessi donatori. LPS e *L. donovani* inducevano IL-18 nelle PBMC e nei monociti. Al contrario, *L. major* non induceva quantità rilevabili di IL-18 nelle stesse cellule. In conclusione, sulla base dei risultati ottenuti, è possibile ipotizzare che i monociti periferici possano svolgere un ruolo differente nella risposta dell'ospite verso diverse specie di *Leishmania*. In particolare, la produzione di IL-18 durante l'interazione precoce con *L. donovani* potrebbe rappresentare un importante evento nella interazione tra queste cellule ed il parassita.

Lavoro finanziato dal Ministero della Ricerca Scientifica e Tecnologica, progetto nazionale "Controllo della patogenicità microbica", cofinanziamento prot. 9706247700-005, e dalla Università di Messina (ex 60 %)

*Specializzata, ** Specializzanda presso la Scuola di Specializzazione in Microbiologia Applicata della Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, Università di Messina.

INFEZIONE CONGENITA DA CMV: LA NOSTRA ESPERIENZA

R. Garozzo*, G. Costa*, R. Dinaro**, C. I. Palermo****, C.M. Costanzo,
A. Sciacca***, G. Scalia****, C.M. Costanzo ****, C.I. Palermo****

*Dip. Pediatria

**Dottorato di Ricerca Malattie Genetiche dell'Età Evolutiva

*** Lab. Analisi Az. Policlinico

****Dip. Scienze Microbiologiche e Ginecologiche

L'infezione congenita da CMV è la più frequente causa di ritardo mentale e di sordità neurosensoriale non ereditaria (0.5-2 % dei nati). Il CMV è ubiquitario e determina generalmente un'infezione a decorso subclinico; i soggetti immunocompromessi, quelli sottoposti a terapie immunosoppressive e i neonati, prima del concepimento o durante il parto, possono presentare invece i segni dell'infezione. Il contagio può avvenire per via transplacentare o per trasmissione orizzontale perinatale, al momento del parto o nei primi mesi di vita. Le manifestazioni cliniche dell'infezione congenita precoce vanno dalle forme più gravi con importanti sequele neurologiche fino al ritardo mentale, che sono evidenti precocemente, alle forme più lievi che invece possono manifestarsi anche a distanza di anni con compromissione delle funzioni uditive con sordità neurosensoriale non ereditaria, disturbi cognitivi e comportamentali. Le forme da contagio diplacentare tardivo invece determinano prevalentemente sintomatologia pluriviscerale a carico di organi quali il fegato, apparato emopoietico, polmone senza interessare però il sistema nervoso.

Presso il Day Hospital del dipartimento di Pediatria dell'Università di Catania dal Gennaio 2001 a tutt'oggi sono stati diagnosticati 40 soggetti che hanno contratto l'infezione da CMV, di questi 35 nel periodo fetale, ma senza mostrare segni di infezione congenita (assenza di lesioni cerebrali o di corioretinite) e graduale riduzione nell'eliminazione del virus nelle urine e nella saliva. In due casi abbiamo rilevato gli esiti da infezione precoce in gravidanza: il primo con la presenza di microcefalia, ipoplasia cerebellare e corioretinite, il secondo con convulsioni, lissencefalia completa e corioretinite, entrambi trattati con Ganciclovir. Tre pazienti hanno contratto l'infezione in epoca perinatale manifestando segni prevalentemente viscerali: epatite (2 casi), polmonite interstiziale (1 caso) anche questi trattati con Ganciclovir.

Tutti i nostri pazienti sono stati sottoposti ad esami di controllo seriati a cadenza mensile che prevedono l'esecuzione di esame emocromocitometrico, bilirubinemia, transaminasemia, indici di flogosi, ricerca Dna CMV tramite PCR su campione di saliva, urine e siero, anticorpi anti CMV (IgG, IgA, IgM), visita oculistica, esame ecografico cerebrale transfontanellare, otoemissioni, potenziali evocati uditivi, visita neurologica con valutazione dello sviluppo psicomotorio, visita neuropsichiatrica.

INFEZIONI DA *CAMPYLOBACTER JEJUNI* IN ALLEVAMENTI AVICOLI DELL'ITALIA MERIDIONALE

*Di Modugno G., *Camarda A., §Parisi A., §Montagna C. *Di Modugno D.

*Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali, Sezione di Patologia Aviare, Università degli Studi di Bari.

Strada Provinciale per Casamassima Km 3 70010 Valenzano (Bari - Italia). Tel +390804679912,

e-mail g.dimodugno@veterinaria.uniba.it

§Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata

Campylobacter jejuni provoca tossinfezioni alimentari nell'uomo prevalentemente a seguito del consumo di carni poco cotte di pollame che viene considerato principale serbatoio del germe. Le presenti ricerche in allevamenti di galline per la produzione di uova da consumo hanno dimostrato che *C. jejuni* può essere evidenziato dall'85,71% dei gruppi testati con una percentuale di isolamento del germe nei singoli flocks consistente e compresa tra il 26% ed il 73,3%. Il germe è stato isolato oltre che dall'intestino (41,9%), anche dall'ovidutto (54,46%) e dal guscio delle uova deposte (11,76%). La biotipizzazione secondo Lior (1984) dei ceppi isolati ha dimostrato la prevalenza dei biotipi 2 (47,27%) ed in particolare del biotipo 1 (50,9%), frequentemente associato a casi umani di enterite. La PCR-RFLP della flagellina A ha evidenziato che le popolazioni batteriche differenziate in biotipi non sono geneticamente omogenee. È ipotizzabile, pertanto, che non tutti gli stipti del germe posseggano un uguale potere patogeno e rappresentino un reale rischio per la sanità pubblica. L'uso combinato di due endonucleasi di restrizione (*HinfI* e *DdeI*) sullo stesso amplificato ha consentito di distinguere in tre allevamenti di galline ovaiole privi di qualsiasi contatto fra loro e posti in aree geograficamente distanti, popolazioni batteriche specifiche (Allevamento A, profili 1/1, 2/2, 2/3; Allevamento B profili 1/4, 2/6, 3/5; Allevamento C profili 1/4, 3/7, 1/8, 1/9) e la prevalenza di un tipo genetico sugli altri profilo 1/1, 1/4, 3/7) rispettivamente nelle aziende A, B, C).

Dalle ricerche effettuate sembrerebbe che in ciascun gruppo di animali allevato possa svilupparsi una popolazione autoctona di *C. jejuni* che potrebbe avere origine parentale (Cox *et al.* 1999) o ambientale (Jacobs-Reitsma 1997). Quest'ultima ipotesi sembra supportata dalle nostre ricerche le quali evidenziano che sino all'età di 15 giorni circa dai pulcini e dai ricoveri non è possibile isolare il *C. jejuni*, mentre, con l'aumentare dell'età sia gli animali che l'ambiente di allevamento appaiono contaminati.

INFEZIONI DA MICOBATTERI E MODULAZIONE DELL'ASMA SPERIMENTALE MURINO.

Sabrina Mariotti, Raffaella Teloni, Lanfranco Fattorini, Roberto Nisini.

Laboratorio Batteriologia e Micologia Medica, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

L'eziologia dell'asma è eterogenea e sempre maggiore importanza viene attribuita agli agenti infettivi, non solo in quanto possono essere associati all'innescio o all'aggravamento dell'iperreattività bronchiale che caratterizza la malattia, ma anche in quanto possibili modulatori della produzione di IgE specifiche per allergeni e quindi nel priming della risposta allergica. La sintesi di IgE appare infatti essere in relazione con la espansione di linfociti T helper di tipo 2 (Th2) specifici per allergeni. Dati epidemiologici indicano come l'aumento delle allergie possa essere messo in relazione con il miglioramento delle condizioni igieniche nei paesi industrializzati e quindi con la diminuzione di infezioni. Questi dati possono essere interpretati alla luce del fatto che la maggior parte delle infezioni, così come l'uso di oligonucleotidi contenenti CpG motifs sintetizzati sulla base del DNA batterico, inducendo una risposta linfocitaria helper di tipo 1, possano favorire anche la espansione di linfociti T helper di tipo 1 (Th1) specifici per gli allergeni, che condizionano la secrezione di Ig di isotipo diverso dalle IgE. Per una verifica sperimentale di tale ipotesi, è stato messo a punto un modello di asma murino sperimentale all'ovalbumina (OVA). La valutazione della sensibilizzazione è stata valutata con il dosaggio di IgE totali e specifiche per OVA e la severità della patologia con la conta di eosinofili nel lavaggio broncoalveolare (BAL). L'insorgenza e la modulazione della sintomatologia asmatica è stata quindi studiata in animali che venivano infettati per via nasale e/o peritoneale con batteri noti per indurre una tipica risposta Th1, come *M. avium* o BCG, prima o dopo la sensibilizzazione allergica. In parallelo è stata studiata la modulazione della risposta asmatica indotta da CpG motifs. I risultati indicano che mentre i CpG motifs sono in grado di inibire sia la produzione di IgE specifiche che il recruitment di eosinofili nel polmone, le infezioni batteriche possono modificare il recruitment di eosinofili ma non contribuiscono alla riduzione della sensibilizzazione allergica valutata come produzione di IgE. In conclusione i dati confermano anche a livello sperimentale la dicotomia esistente tra atopia e sintomatologia asmatica e suggeriscono che oltre al ruolo dell'induzione di IFN γ e IL-12, i CpG motifs si caratterizzano per una funzione diversa da quella dell'infezione batterica, che potrebbe coinvolgere IFN di tipo I.

INFLUENZA DELLA SIMBIOSI CON *MYCOPLASMA HOMINIS* NEI CONFRONTI DEI MECCANISMI DI PATOGENICITA' DI *TRICHOMONAS VAGINALIS*

¹Paola Rappelli, ¹Maria Antonietta Cuccuru, ¹Laura Mammarella, ¹Claudia Zanazzi, ²Nigel Yarlett, ¹Pier Luigi Fiori.

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

²Haskins Laboratories and Department of Chemistry and Physical Sciences, Pace University, New York, USA.

Il protozoo flagellato *Trichomonas vaginalis* ed il batterio *Mycoplasma hominis* stabiliscono un rapporto di simbiosi durante l'infezione vaginale: questa stretta relazione è confermata dalla frequente associazione clinica dei due microorganismi. Vista la capacità di *M.hominis* di sopravvivere e moltiplicarsi nel citoplasma del protozoo, è facile comprendere quali vantaggi derivino al batterio dalla simbiosi: mascheramento dalle difese immunitarie, protezione dall'azione di farmaci, utilizzo di *T.vaginalis* quale mezzo di trasporto interumano. Non è però stato ancora determinato se anche il protozoo tragga vantaggi selettivi dallo stretto rapporto con il batterio.

In questo lavoro è stata studiata l'influenza della simbiosi su alcune caratteristiche peculiari di *T.vaginalis*: la capacità di indurre un danno di membrana nella cellula ospite e la modulazione di importanti vie biochimiche legate al metabolismo delle poliamine (che influenza fortemente la capacità di crescita del protozoo ed è utilizzato dal batterio per produrre ATP). Il danno citolitico provocato dal protozoo è legato a complessi meccanismi in cui giocano un ruolo coordinato tossine formanti poro ed enzimi in grado di degradare specificamente il citoscheletro sub-membranale della cellula ospite. L'attività citotossica è stata studiata utilizzando globuli rossi umani quali membrane bersaglio, confrotando l'emolisi di ceppi associati a micoplasmi con quella da ceppi axenici. Allo scopo di evitare la variabilità tra ceppi, isolati di *T.vaginalis* mycoplasma-free sono stati infettati con differenti *M.hominis*. I risultati ottenuti dimostrano che: a) la presenza di micoplasmi aumenta notevolmente le capacità citolitiche del protozoo; b) tale aumento è proporzionale alla molteplicità di infezione; c) i micoplasmi intracellulari giocano un ruolo fondamentale in questa modulazione.

Per quanto riguarda il metabolismo delle poliamine sono stati utilizzati gli stessi ceppi infettati sperimentalmente. I risultati ottenuti dimostrano che i ceppi di *T.vaginalis* associati a *M.hominis* presentano una attività degli enzimi arginina deiminasi e ornitina carbamiltransferasi (sia anabolica che catabolica) notevolmente superiore a quelle dei ceppi mycoplasma-free.

INTERAZIONE *IN VITRO* TRA *HELICOBACTER PYLORI* E CELLULE DI CARCINOMA GASTRICO (AGS)

M. Orlando, B. Perfetto, R. Greco, D. Solla, M.A. Tufano

DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE, SEZIONE DI MICROBIOLOGIA E MICROBIOLOGIA CLINICA- SECONDA UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

H. pylori è un batterio microaerofilo responsabile di gastriti, ulcere gastriche ed associato con adeno-carcinoma gastrico e linfoma B-cell. E' stato considerato un microrganismo extracellulare anche se, in alcuni casi, sia *in vivo* che *in vitro* è stata dimostrata una penetrazione all'interno delle cellule gastriche. Probabilmente il tipo di colonizzazione è dovuto sia a fattori delle cellule ospiti sia alle caratteristiche genetiche del ceppo in esame. *H. pylori* danneggia la mucosa gastrica, aderendo ad essa attraverso piedistalli di adesione. Scopo del lavoro è stato analizzare l'interazione di alcuni ceppi batterici di *H. pylori* (2 isolati clinici ed un ceppo ATCC 43504), con cellule di carcinoma gastrico (AGS). Abbiamo valutato l'espressione di integrine quali alpha-v beta 5 e l'espressione di heat shock proteins (HSP 70) in presenza o assenza di anticorpo bloccante anti-TGF- β in cellule AGS infettate con *H. pylori* per 2, 4, 16 e 24h. E' stata valutata, inoltre, l'eventuale modulazione di fattori angiogenici quali PLGF e VEGF in presenza o meno di citochine come IFN- γ . Per gli esperimenti abbiamo utilizzato tecniche di analisi di western-blot e RT-PCR.

In vitro i ceppi utilizzati si sono dimostrati non invasivi, ma con un adesività già visibile dopo 2h di infezione. E' stato riscontrato: un aumento dell'espressione di alpha-v beta5 già a 2h di infezione, evidente ancora a 4h e 16h che a 24h comincia a decrescere; una variazione dell'espressione delle HSP-70 ed una modulazione dell'espressione dei geni che codificano la produzione dei fattori angiogenici PLGF e VEGF. I risultati ottenuti suggeriscono che tali fattori, indotti da *H. pylori*, possano contribuire alla capacità di tale batterio di instaurare un'infezione persistente e di favorire un processo di carcinogenesi gastrica.

ISOLAMENTO DI *SALMONELLA spp* DA PESCI TROPICALI IMPORTATI IN ITALIA

A. Salvaggio, S. Pignato*, V. Iannotta, R. P. Giunta, S. Caracappa

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri"

Dipartimento F.G. Ingrassia, sezione Igiene e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Catania *

Secondo la normativa vigente campioni prelevati da ogni partita di pesci tropicali importati nei Paesi Comunitari e destinati ai negozi di acquariofilia devono essere sottoposti ad analisi batteriologica per l'identificazione di *Salmonella spp* e *Vibrio cholerae*. Per quanto riguarda il nostro Paese tali esami sono eseguiti dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del territorio di destinazione finale degli animali in oggetto, prima che questi ultimi vengano messi in commercio. Fintanto che non siano resi noti i risultati degli esami ogni partita deve essere posta sotto sequestro cautelativo da parte dei Servizi Veterinari dell'ASL competente per territorio.

Nell'anno 2001 sono pervenuti presso la Sezione Diagnostica Interprovinciale di Catania dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" 56 campioni di pesci tropicali e relativa acqua di trasporto prelevati da altrettante partite giunte nel territorio di competenza, affinché fossero eseguiti gli esami previsti. Di tali partite 35 provenivano da Singapore, 16 dalla Thailandia e 5 dallo Sri Lanka.

Dei 56 campioni di pesci tropicali esaminati, 3 sono risultati positivi per *Salmonella spp*. La tipizzazione ha dato i seguenti risultati:

Salmonella bovismorbificans (6,8 : r : 1,5)

Salmonella paratyphi B (4,5,12 : b : 1,2)

Salmonella hindmarsh (8,20 : r : 1,5)

L'isolamento di *Salmonella spp* da pesci tropicali ornamentali pone l'accento sul rischio infettivo connesso all'importazione di questo tipo di animali. Tale rischio, maggiormente evidente e noto nel caso di altri animali d'importazione, quali ad esempio i rettili, nel caso degli acquari ornamentali è normalmente sottovalutato, anche per l'aspetto "igienico" con cui essi normalmente si presentano, ma la prevalenza di tali isolamenti solleva qualche preoccupazione di ordine sanitario.

A parte le normali precauzioni igieniche che tutti dovrebbero osservare nell'accudire questo tipo di animali, alla luce di tali isolamenti particolare attenzione dovrebbe essere rivolta a bambini, anziani e soggetti immunodepressi, ai quali dovrebbero essere vietate le operazioni di svuotamento e pulizia degli acquari.

E' da sottolineare, infine, il ruolo svolto dagli Istituti Zooprofilattici Sperimentali nella tutela della salute pubblica, in questo caso anche sotto forma di barriera sanitaria alla introduzione nel nostro Paese di ceppi di *Salmonella* "esotici" e quindi particolarmente pericolosi.

ISOLAMENTO DI UNA VARIANTE DEL GENE *ermTR*

P. M. Furneri¹, P. Di Pietro¹, F.D. Poli¹, G. Tempera¹, V. M. Nicolosi¹, G. Rappazzo², G. Bisignano³

¹Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche e ²Dipartimento di Biologia Animale, Università di Catania

³Dipartimento Farmacobiologico Università di Messina

La famiglia di geni *erm* comprende un gruppo di metilasi omologhe che usano la S-Adenosilmetionina come donatore di gruppi metilici. Dal punto di vista funzionale possiamo distinguere due classi di metilasi *erm*: A) la prima classe include le monometilasi espresse dai geni, *lmr*, *clr*, *tlrd*; B) la seconda classe include invece le dimetilasi espresse dai geni *ermC*, *ermE*, *ermAM*, *ermTR*, *ermSF*.

Scopo del presente lavoro è stato: lo studio del genotipo del ceppo resistente ME-8 (1996); il sequenziamento del gene di resistenza; l'analisi amminoacidica della proteina codificata da tale gene.

Il ceppo ME-8 è stato coltivato in terreno agar-sangue CNA a 37° C per 18 h. Le MIC sono state ottenute utilizzando il metodo delle microdiluzioni e quello di Kirby-Bauer. L'estrazione del DNA e le procedure per l'amplificazione sono state condotte con procedure atte all'isolamento ed identificazione dei geni *ermAM*, *ermTR*, e *mefA*. Il ceppo inizialmente ha mostrato un fenotipo di tipo costitutivo, con sensibilità solo alla josamicina, successivamente, in alcune subculture, si è mostrato "intermedio" per l'eritromicina ed ancora sensibile alla josamicina. Il sequenziamento degli amplificati ha evidenziato solo la presenza del gene *ermTR*, purtuttavia la sequenza del gene da noi isolato (AF443782) ha mostrato alcune variazioni rispetto alla sequenza conosciuta. Delle tre mutazioni puntiformi osservate e analizzate con il programma di allineamento Clustal W, solo due determinano in fase traduzionale mutazioni amminoacidiche. Le due mutazioni amminoacidiche sono una serina al posto di una prolina in posizione 75, ed una prolina al posto di una serina in posizione 228. La prima sostituzione potrebbe determinare una linearizzazione del dominio coinvolto, di converso la seconda condurrebbe all'introduzione di una zona di eventuale torsione.

L'ESPRESSIONE CONTEMPORANEA DI *ICAA* ED *ICAD* DETERMINA LA PRODUZIONE DI BIOFILM IN *S.EPIDERMIDIS* INDIPENDENTEMENTE DALLA LORO FONTE D'ISOLAMENTO

Cafiso V., Campanile F., Santagati M., Di Bassiano F., Nicoletti G. e Stefani S.

Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Ginecologiche-Università degli Studi di Catania

Il locus *ica* contenente i geni *icaR*, A, D, B, C è responsabile della produzione di un'adesina-polisaccaridica-intercellulare (PIA) necessaria all'adesione intercellulare ed alla fase d'accumulo del biofilm in *S.epidermidis*. Secondo alcuni autori, la produzione di PIA è regolata da un meccanismo di variazione di fase mediato dall'IS256. Su 40 isolati clinici di *S.epidermidis*, è stata da noi studiata: la produzione quantitativa e qualitativa di biofilm mediante saggio spettrofotometrico e Congo-red-agar; l'analisi genetica dell'operon-*ica* mediante PCR con primers descritti da Ziebuhr et al; l'espressione mediante RT-PCR utilizzando primers specifici appositamente disegnati; la presenza dell'intero locus *ica* mediante ibridazione con sonda *ica*-locus specifica; la genetica di popolazione e l'analisi filogenetica (UPGMA) del campione in studio dopo PFGE. L'amplificazione genica (PCR) condotta utilizzando la prima coppia di primers metteva in evidenza due diverse organizzazioni geniche del *ica*-operon. Gli amplimeri di *icaA* che risultavano di dimensioni maggiori erano sottoposti a sequenziamento per ricercare la presenza di IS256. Le sequenze ottenute non confermavano tale ipotesi. Inoltre, le ibridazioni dei gel di PFGE con la sonda *ica*-locus specifica erano negative.

L'analisi dei geni dell'*ica*-operon con nuovi primers mostrava che 19 ceppi erano positivi e 21 negativi. Questo dato confermava l'analisi spettrofotometrica quantitativa e qualitativa di produzione di biofilm. Inoltre, in tutto il campione positivo alla PCR con i nuovi primers, i risultati d'ibridazione con la sonda *ica*-operon ne confermavano la presenza.

Lo studio dell'espressione dei geni *ica* mediante RT-PCR dimostrava che è necessaria la co-espressione di *icaA-D* affinché il biofilm venga prodotto. L'analisi di popolazione mostrava che i ceppi isolati da catetere clusterizzano in un gruppo omogeneo rispetto agli isolati nosocomiali.

In conclusione, l'espressione dei geni dell'*ica*-operon determina la produzione di biofilm in *S.epidermidis* ed i nostri risultati dimostrano che questo locus è presente nei ceppi indipendentemente dal luogo d'isolamento, sebbene l'analisi genetica dimostri che gli isolati da catetere siano un cluster più ristretto. In nessun caso è stata identificata la presenza di IS256 all'interno del locus.

LA CAPSULA DEL *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* INIBISCE LA MATURAZIONE E L'ATTIVAZIONE DELLE CELLULE DENDRITICHE UMANE

D. Pietrella, P. Lupo, F. Bistoni, A. Vecchiarelli

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

Introduzione: L'immunità cellulo-mediata (CMI) è considerata la risposta protettiva nei confronti del *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*). Tale risposta è innescata e condizionata in maniera determinante dalle cellule presentanti l'antigene e questa funzione è svolta essenzialmente dalle cellule dendritiche (DC).

Scopo: In questo studio è stato valutato il ruolo del materiale capsulare del *C. neoformans* nel processo di attivazione e maturazione delle DC derivate da monociti umani.

Disegno sperimentale: Le DC sono state ottenute stimolando i monociti umani con GM-CSF e IL-4 per sei giorni. Le DC immature così ottenute sono state incubate con *C. neoformans* capsulato B3501 e privo di capsula CAP67, dopo incubazione è stata valutata l'espressione delle molecole di superficie mediante analisi citofluorimetrica. Per determinare l'attivazione delle cellule T da parte delle DC sono state analizzate la linfoproliferazione e la produzione di citochine.

Risultati: Le DC hanno mostrato differenze nella risposta verso i due ceppi del *C. neoformans*. In particolare: 1) il ceppo acapsulato CAP67 era facilmente fagocitato da parte delle DC immature e tale processo induceva la maturazione di tali cellule aumentando l'espressione delle molecole caratteristiche delle DC mature, quali MHC I, MHC II, CD40 e CD83; 2) viceversa il ceppo capsulato B3501 non aumentava l'espressione di tali recettori, e il glucuronoxilomannano (GXM), principale costituente della capsula polisaccaridica, non era in grado di mediare tale effetto; 3) l'aggiunta dell'anticorpo monoclonale (mAb 18B7) specifico verso il GXM facilitava la maturazione delle DC promuovendo l'ingestione del lievito mediante il CD32 (Fc γ RII) e il CD16 (Fc γ RIII); 4) le DC mature permettevano un'efficiente attivazione e differenziazione delle cellule T come dimostrato dall'aumento della linfoproliferazione e della produzione di IFN- γ .

Conclusioni: Questi risultati indicano che la capsula del *C. neoformans*, ma non il polisaccaride solubile, inibisce l'attivazione e la maturazione delle DC. Questo processo può essere considerato una nuova via con cui il fungo interferisce con la risposta delle cellule T. Quindi la manipolazione delle DC potrebbe promuovere la risposta immune cellulare protettiva verso il *C. neoformans*.

LA PREVENZIONE DA PARTE DI BCL-2 DELL'APOPTOSI INDOTTA DA HSV-2 AUMENTA LA RESA VIRALE IN CELLULE MONOCITOIDI

¹Perri D., ¹Medici M.A., ¹Sciortino M.T., ¹Valveri V., ¹D'Ascola A., ¹Spagnolo A., ²Grelli S., ³Borner C., ¹Mastino A..

¹Dip. Sci. Microbiol., Gen. e Mol., Università di Messina, Messina; ²Dip. Med.Sper. e Sci.Biochim., Policlinico "Tor Vergata", Università di Roma "Tor Vergata"; ³ Inst. for Mol. Med. and Cell Res., Albert-Ludwigs-University of Freiburg, Freiburg, Germany.

Abbiamo dimostrato che herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e herpes simplex tipo 2 (HSV-2) inducono apoptosi in linee cellulari di tipo linfoide e monocitoide (Mastino et al. 1997). L'apoptosi era associata ad un'infezione produttiva e mediante analisi in citometria a flusso è stata dimostrata una regolazione negativa delle proteina Bcl-2 nel corso dell'infezione. Scopo del presente lavoro è stato quello di indagare gli effetti dell'interferenza con la morte cellulare apoptotica nella replicazione di HSV-2 in cellule monocitoidi. Per indagare se l'aumento dell'espressione di Bcl-2 potesse interferire con il ciclo replicativo virale e con l'apoptosi indotta da HSV-2 sono state utilizzate cellule U937 trasfettate stabilmente con un plasmide contenente Bcl-2 murino. Inoltre, in altri esperimenti, la cascata delle caspasi è stata bloccata utilizzando peptidi sintetici analoghi ai substrati naturali con effetto inibitorio sull'attività delle caspasi cellulari. In particolare, sono stati utilizzati Z-VAD-FMK, che è un inibitore a largo spettro, Z-DEVD-FMK e Z-IED-FMK, che invece agiscono specificamente su caspasi 3 e caspasi 8, rispettivamente. I principali risultati possono essere così riassunti. La "over-espressione" di Bcl-2 in cellule U937: i) proteggeva dall'apoptosi indotta da HSV-2; ii) aumentava l'infettività delle cellule fino ad arrivare a circa il 100% di cellule infette; iii) aumentava la capacità delle cellule di produrre virioni infettanti. Gli esperimenti condotti utilizzando gli inibitori delle caspasi hanno mostrato che: i) Z-VAD-FMK protegge dall'apoptosi indotta da HSV-2; ii) Z-VAD-FMK aumenta l'infettività delle cellule U937; iii) Z-VAD-FMK non modifica la produzione virale; iv) Z-DEVD-FMK e Z-IED-FMK non bloccano l'apoptosi indotta da HSV-2. Questi risultati indicano che l'inibizione dell'apoptosi a livelli differenti influisce in modo differenziale sulla produzione virale.

LA PROTEINA UL49 DI HSV-1 E' IN GRADO DI LEGARE E TRASFERIRE mRNA FUNZIONALMENTE EFFICIENTE DA CELLULA A CELLULA

¹Sciortino M.T., ²Taddeo B., ²Poon A.P.W.,³Matteucci C., ²Roizman B., ¹Mastino A.

¹Dip. Sci. Microbiol., Gen. e Mol., Univ. di Messina; ²The Marjorie B. Kovler Viral Oncology Lab., University of Chicago;

³Dip. Med.Sper. e Sci.Biochim., Univ. Roma "Tor Vergata";.

Alcuni di noi hanno recentemente dimostrato che herpes simplex tipo 1, che come tutti gli herpesvirus è un virus a DNA, contiene in realtà nelle sue particelle virali porzioni di mRNA intatto e funzionalmente efficiente che non corrispondono strettamente alle specie di mRNA presenti in maggiore quantità nelle cellule infettate (Sciortino et al., J. Virol., 2001). Abbiamo quindi cercato di stabilire il ruolo degli mRNA presenti nelle particelle virali e se nel meccanismo di montaggio di tali RNA fossero coinvolte proteine virali. Utilizzando la metodica del "NorthWestern assay" abbiamo osservato che le tre proteine tegumento di HSV-1 UL47, UL49 e US11 erano coinvolte nell'interazione virioni/mRNA. Considerando come precedenti lavori avevano dimostrato la capacità della proteina virale UL49 di diffondersi da cellula a cellula durante l'infezione da HSV-1 si è voluto quindi indagare la capacità di UL49 di trasferire mRNA da cellula a cellula. Sono stati eseguiti esperimenti di cocoltivazione in cui cellule HEp-2, co-infettate con baculovirus trasducenti esprimenti UL49 o US8.5/GFP, sono state mescolate con cellule Vero. Utilizzando il gene chimero US8.5/GFP come marcatore per il trasferimento di mRNA è stato eseguito uno studio in citometria a flusso per analizzare l'espressione di tale gene in cellule Vero dopo cocoltivazione. I risultati ottenuti hanno mostrato che una ristretta ma ben rilevabile porzione delle cellule Vero diveniva positiva per la GFP dopo cocoltivazione con cellule HEp-2 doppio-trasdotte, ma non con cellule HEp-2 singolo-trasdotte con US8.5/GFP, e che l'espressione di GFP era impedita dall'aggiunta dell'enzima Rnasi al mezzo di coltura. Questi dati consentono di formulare l'ipotesi che la proteina UL49 di HSV-1 sia in grado di legare e trasferire mRNA funzionalmente efficiente da cellule infette a cellule adiacenti non infette. Tale fenomeno, che rappresenta una novità assoluta nella biologia dei virus, potrebbe avere importanti implicazioni sia nel campo delle conoscenze di base delle infezioni virali che in quello delle biotecnologie.

LA RISPOSTA ANTICORPALE CONTRO LE PROTEINE HSP60 DI *CHLAMYDIA PNEUMONIAE* È FORTEMENTE ASSOCIATA ALLE SINDROMI CORONARICHE ACUTE.

A. Cervo, A. Petrucca, L.M. Biasucci*, G. Liuzzo*, M. Piro*, D.J. Angiolillo*, F. Crea*, A. Maseri**, A. Cassone.

Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica, Istituto Superiore di Sanità, Roma; * Istituto di Cardiologia, Università Cattolica di Roma; **Università Vita e Salute, Milano.

Le proteine heat-shock (HSP) appartengono alla famiglia delle chaperonine aventi elevate proprietà immunogeniche e pro-infiammatorie. Inoltre, HSP60 umana e di *Chlamydia pneumoniae* (cp) –proteine largamente omologhe-, sono state rilevate nella malattia coronarica stabile.

Abbiamo preso in esame una coorte di 219 pazienti con sindrome coronarica acuta (ACS), di cui 179 sofferenti di angina instabile (UA) e 40 di infarto miocardico acuto (MI), 27 pazienti con angina stabile (SA) e 100 soggetti sani (C). Abbiamo misurato i livelli plasmatici di IgG diretti contro *C. pneumoniae* attraverso un saggio standard di micro immunofluorescenza (MIF), le IgG dirette contro cp-HSP 60 attraverso un saggio ELISA in-house con HSP60 ricombinante di *C. pneumoniae* (1), la proteina C-reattiva (CRP) e i livelli di troponina T (TnT).

Sieropositività a cp-HSP 60 è stata rilevata nel 99% dei pazienti con ACS ma solo nel 19% in quelli con SA ed in nessuno nei controlli ($p=0.0001$ ACS rispetto a C, $p=0,003$ ACS rispetto a SA e $p=0.05$ SA rispetto a C). IgG anti-chlamydia (MIF) sono state rilevate nel 70% dei pazienti ACS, nel 74% dei pazienti SA e nel 30% dei controlli di quelli C ($p=0.001$ ACS e SA rispetto a C). Non sono state rilevate differenze negli anticorpi anti-cp HSP60 e quelli anti-Chlamydia fra i pazienti MI e UA e fra i livelli di TnT e quelli di CRP o fra MIF e CRP. In tutti e 27 pazienti ACS tenuti sotto osservazione durante il follow-up i livelli anticorpali anti cp-HSP60, ma non quelli MIF, sono diminuiti consistentemente, divenendo negativi in 6 pazienti.

In conclusione, gli anticorpi anti-HSP60 sembrano essere un marker quasi assoluto nelle sindromi ACS, indipendentemente dall'aumento dei livelli anticorpali anti-Chlamydia e dai livelli anticorpali di CRP e TnT e anche presumibilmente in relazione ad una risposta auto-immune. Il loro ruolo eziologico nell'instabilità e nella diagnosi delle ACS merita di essere ulteriormente indagato.

(1) Cervo et al. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**:66-74, 2002

LE PORINE DI *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR TYPHIMURIUM REGOLANO L'ESPRESSIONE DI mRNA PER LE CITOCHINE MEDIANTE DIFFERENTI VIE DI FOSFORILAZIONE

Marilena Galdiero¹, Annalisa Tortora², Nicola Damiano², Emilia Galdiero³ e Massimiliano Galdiero¹

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Microbiologia e Microbiologia Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Seconda Università degli Studi di Napoli;

²Dipartimento di Patologia Generale, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Seconda Università degli Studi di Napoli;

³Dipartimento di Fisiologia Generale e Ambientale, Sezione di Igiene e Microbiologia, Università degli Studi di Napoli Federico II.

Il lipopolisaccaride (LPS) e le porine della membrana esterna dei batteri Gram negativi sono i principali fattori patogeni implicati nello shock settico. Le porine e l'LPS presentano attività biologiche simili pur utilizzando probabilmente differenti meccanismi di attivazione cellulare. In questo lavoro abbiamo analizzato, mediante l'uso di alcuni inibitori della via di trasduzione del segnale MEK/ERK, la capacità delle porine di *Salmonella enterica* serovar Typhimurium di indurre il rilascio di diverse citochine proinfiammatorie ed immunologiche in cellule U937 stimulate con porine (5 µg/ml) o LPS (1 µg/ml) per 2 h, 4 h e 8 h. Sono stati utilizzati tre differenti inibitori delle vie di fosforilazione: 2'-amino-3'-metossiflavone (PD-098059), un inibitore selettivo di MEK1 e della cascata MAPK; 4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)1H-imidazolo (SB-203580), inibitore specifico di p38; 7β-acetossi-1α,6β,9α-triidrossi-8,13-epossilabd-14-en-11-one (forskolin), inibitore della chinasi Raf-1.

L'analisi, mediante RT-PCR dell'espressione degli mRNA per TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 e GM-CSF, ha mostrato che l'espressione di TNF-α, IL-1β e GM-CSF veniva ridotta dal pretrattamento con PD-098059 dopo stimolazione con LPS ma non con porine, mentre l'espressione di IL-10 indotta dopo stimolazione con porine veniva ridotta dal pretrattamento sia con PD-098059 che con SB-203580. Al contrario, l'espressione degli mRNA di IL-6 e IL-8 non veniva modificata dal pretrattamento con PD-098059 o SB-203580, dopo stimolazione sia con porine che con LPS. Nei nostri esperimenti il forskolin non presentava alcun effetto sull'espressione delle citochine analizzate.

LE PORINE DI *SALMONELLA TYPHIMURIUM* REGOLANO L'ESPRESSIONE DELLE MOLECOLE CD80 E CD86 SU CELLULE B E MACROFAGI MA NON LE MOLECOLE CD28 E CD152 SU CELLULE T.

Marilena Galdiero⁽¹⁾, Maria Grazia Pisciotta⁽²⁾, Emilia Galdiero⁽³⁾, Caterina Romano Carratelli⁽¹⁾

⁽¹⁾ Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Microbiologia e Microbiologia Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Seconda Università di Napoli

⁽²⁾ Dipartimento di Patologia Generale, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Seconda Università di Napoli

⁽³⁾ Dipartimento di Fisiologia Generale, Sezione di Igiene e Microbiologia, Università di Napoli "Federico II"

E' di considerevole interesse identificare i segnali biologicamente importanti, mediati da cellule batteriche o dai loro componenti, che regolano le molecole di costimolazione, CD80/CD86 e CD28/CD152. Le porine giocano un ruolo importante nella risposta immunologica sia come antigeni sia come molecole capaci di influenzare diverse attività biologiche nelle cellule immunocompetenti. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'effetto delle porine di *S. typhimurium* sulle molecole di costimolazione. Le interazioni tra queste molecole possono influenzare la risposta immune mediante la regolazione del rilascio di citochine. I nostri risultati hanno mostrato che le porine di *S. typhimurium* aumentavano l'espressione delle molecole CD86 e CD80 su linfociti B e macrofagi, mentre risultava inalterata l'espressione delle molecole CD28 e CD152 sui linfociti T. Inoltre, è stato rilevato che l'espressione dei recettori CD80 e CD86 era dose-dipendente, iniziava 24 ore dopo il trattamento con stimoli batterici, raggiungeva il plateau dopo 48 ore e ritornava ai valori basali dopo 72 ore. Le porine, quindi, inducono una maggiore espressione di molecole CD86 contribuendo alla risposta Th-2.

LEISHMANIOSI VISCERALE : ANALISI RETROSPETTIVA DEI CASI OSSERVATI IN PUGLIA NEL CORSO DEGLI ULTIMI 3 ANNI

Monno R.*, Bolognese P., De Nicolò T., Coscia F., De Vito R., Rizzo G.

Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Pubblica; Sezione di Igiene, * Cattedra di Microbiologia, Università degli Studi di Bari, Bari

Durante il periodo settembre 1999 – agosto 2002 sono stati esaminati un totale di 250 pazienti con sospetto di Leishmaniosi. La diagnosi è stata eseguita mediante immunofluorescenza indiretta e/o presenza di amastigoti di *Leishmania* nell'aspirato midollare. 17 pazienti (6.8%) risultarono positivi alla sierologia e di questi 8 (47%) evidenziarono presenza di *Leishmania* nell'aspirato midollare. Uno dei pazienti era HIV-positivo e HCV positivo; 9 pazienti (52.9%) erano pazienti pediatrici. La febbre fu presente nel 70.6% dei pazienti.; splenomegalia ed epatomegalia furono riscontrate rispettivamente nel 100% e nel 94% dei casi. Inoltre fu osservata trombocitopenia nel 94% , leucopenia nel 70.5 % , anemia nell' 82.4 % dei pazienti. Aumento della VES e della PCR furono osservate nell'80% dei casi. 9 pazienti furono trattati con meglumina stibiato , 6 con amfotericina B o amfotericina B liposomiale (AmBisome) e 2 pazienti con meglumina e amfotericina B. Non sono state osservate ricadute nei pazienti ritornati al controllo.

Il maggior numero dei casi si è osservato nel 2000 (7 casi) e nel 2001 (6 casi). Per quanto riguarda la distribuzione dei casi 8 pazienti provenivano da Taranto e provincia, 3 da paesi della provincia di Lecce, 4 dalla provincia di Brindisi e 1 dalla provincia di Bari (anche se il paziente aveva soggiornato tre mesi prima, per vacanza, in una località in provincia di Lecce. Un paziente proveniva da un paese della Basilicata.

Essendo i cani il serbatoio di *Leishmania* è auspicabile un maggior controllo del randagismo nonché una lotta al vettore di questo parassita.

LEPTOSPIROSI ANIMALE: METODI DI ANALISI BIO-MOLECOLARE.

M.Vitale, F.Vitale, S.Reale, F. Oliveri, A.Vesco, S. Caracappa.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri"

La leptospirosi rappresenta sicuramente una delle zoonosi riemergenti in tutto il mondo ed è determinata da un batterio spiraleforme del genere *Leptospira*. La presenza di diversi serbatoi naturali tra gli animali domestici e selvatici rende sempre possibile nuove trasmissioni all'uomo, che è recettivo verso un ampio numero di serovar appartenenti alla specie *Leptospira interrogans*, compresa la serovar *hardjo*, della quale è ospite di mantenimento il bovino. Nell'uomo si distinguono solitamente due forme cliniche di leptospirosi: una lieve e una grave. La prima è sostenuta da *L. interrogans serovar hardjo, grippityphosa e pomona*, ma può verificarsi anche con le altre leptospire. La forma a decorso grave è tipica delle infezioni sostenute dalle serovar *icterohaemorrhagiae, copenhageni, bataviae e javanica* ed è caratterizzata da emorragie su cute e mucose, ittero, miocardite, nefropatia ed epatopatia che, se non tempestivamente curati, possono tradursi in insufficienza renale ed epatica con esito anche letale (sindrome di Weil nell'uomo). Nel nostro laboratorio sono in corso di ottimizzazione tecniche basate sulla PCR per la diagnosi rapida e sensibile della leptospirosi. E' stata fatta una prima valutazione di efficienza dei metodi di estrazione di DNA partendo da matrici biologiche diverse come urine ed organi. A tale scopo sono state fatte delle infezioni sperimentali di varie matrici con leptospire ed effettuate prove di diluizioni per la determinazione della sensibilità. Tra i target genetici considerati per l'amplificazione ci sono il gene per l'RNA ribosomiale 16S e la sequenza di inserzione IS 500. Analisi di Amplified Fragments Length Polymorphism AFLP di alcuni ceppi di riferimento sono anche in corso.

M. FURFUR INDUCE L'ESPRESSIONE PKC-DIPENDENTE DI IL10, TGF β E β -DEFENSINA 2 IN CHERATINOCITI UMANI: RUOLO DELL FATTORE DI TRASCRIZIONE AP1

G. Donnarumma, M.A. Tufano

DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE, SEZIONE DI MICROBIOLOGIA E MICROBIOLOGIA CLINICA- SECONDA UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

Malassezia furfur è un lievito lipofilo frequentemente associato all'insorgenza di diverse patologie cutanee croniche tra cui la pityriasis versicolor, dermatite seborroica e psoriasi. I cheratinociti, principali costituenti della cute, oltre ad avere un ruolo strutturale, mediano reazioni immunitarie rilasciando citochine, fattori di crescita e peptidi antimicrobici importanti nell'eliminazione di potenziali patogeni cutanei. Le defensine, piccoli peptidi antimicrobici, rappresentano una delle vie di risposta innata alle infezioni microbiche. Nell'uomo sono state isolate due famiglie di defensine, α e β . Tra le β -defensine particolarmente importanti sono HBD1 e HBD2. La seconda differisce dalla prima sia strutturalmente che per la presenza nella regione promotrice di un sito consenso per il fattore trascrizionale AP1. Nel tentativo di chiarire la risposta dei cheratinociti umani all'invasione di *M. furfur*, abbiamo investigato la modulazione di heat shock proteins (HSP70), l'espressione di alcune citochine proinfiammatorie e immunomodulatorie, di molecole di adesione, il pathway di trasduzione utilizzato ed inoltre il coinvolgimento del fattore trascrizionale AP1. Inoltre, abbiamo analizzato l'espressione di HBD1 e HBD2 in cheratinociti umani infettati con *M. furfur*. Nel nostro modello sperimentale, dopo 24h di trattamento, il lievito aderisce alla superficie del cheratinocita e dopo 48h penetra all'interno del citoplasma, con un'efficienza del 30%; la barriera cutanea viene superata anche attraverso una modulazione negativa della transglutaminasi-1. E' stato, inoltre, osservato che *M. furfur* non induce apoptosi e sopravvive all'interno del cheratinocita almeno fino a 7 giorni di coltura senza formazione di fagolisosoma. Dopo 48h di trattamento, si osserva una evidente induzione di HBD2, PKC-dipendente, mentre l' HBD1 non varia significativamente rispetto al controllo. Inoltre è stato riscontrato assenza di modulazione delle ICAM1, IL8 e una diminuzione delle citochine proinfiammatorie IL1 α e TNF α , associata ad un' assenza dell'espressione dell'IL6 ed un aumento del TGF β 1 e IL10, PKC-dipendente. Infine, nelle stesse cellule si osserva un'attivazione di AP1.

In conclusione i nostri dati suggeriscono che:

M. furfur penetra nei cheratinociti e persiste nelle cellule, inducendo la produzione di IL-10 e TGF β PKC-dipendente, che sopprimono le funzioni microbicide;

HBD1, espressa costitutivamente, è un'importante fattore antimicrobico che agisce contro *M. furfur* in assenza di infiammazione;

HBD2 rappresenta una delle vie della risposta immune innata contro *M. furfur* internalizzato; l'espressione e il rilascio di HBD2 è PKC-dipendente e potrebbe coinvolgere il fattore trascrizionale AP1

MESSA A PUNTO DI UNA METODICA VELOCE PER LA DETERMINAZIONE DEI GENI DI RESISTENZA AI MACROLIDI IN *S.PNEUMONIAE*

Gualco L.*, McDermott J., A. Marchese, E.A. Debbia e G.C. Schito

Sezione di Microbiologia C.A. Romanzi, Università degli Studi di Genova

A partire dagli anni 80 non solo si è assistito ad un notevole aumento di pneumococchi penicillino-insensibili, ma in alcune aree geografiche, tra cui l'Italia, si è verificato un forte incremento della resistenza ai macrolidi. Negli Streptococchi questo carattere risulta regolato da due meccanismi: modificazione del sito bersaglio ed efflusso. Il primo meccanismo conferisce refrattarietà contemporaneamente a macrolidi, lincosamidi e streptogramine (fenotipo MLS_B) ed è dovuto al gene *ermB* o più raramente ad *ermA* sottoclasse *ermTR*; il secondo, caratterizzato da bassi valori di minime concentrazioni inibenti (MIC) ai macrolidi e sensibilità alla clindamicina (fenotipo M), è conferito dal gene *mefA*.

Scopo dello studio è stata la messa a punto di una metodica in grado di permettere la determinazione del genotipo di resistenza ai macrolidi in ceppi di *S.pneumoniae* in circa 4 ore.

Sono stati analizzati 50 ceppi di *S.pneumoniae* (40 con fenotipo MLS_B e 10 con fenotipo M). Le MIC a eritromicina e clindamicina sono state determinate come descritto da NCCLS, 2000. I fenotipi sono stati evidenziati mediante la tecnica del doppio disco con eritromicina (15mg) e clindamicina (2mg). I geni responsabili della insensibilità ai macrolidi sono stati amplificati mediante una tecnica rapida di multiplex PCR, utilizzando primer biotinilati. I prodotti ottenuti sono stati ibridizzati con sonde fluorescinate specifiche per i geni *ermB*, *mefA* ed *ermTR* in micropiastre con pozzetti contenenti streptoavidina, in modo da permettere il legame con l'amplificato biotinilato, come già descritto da Farrell *et al.*, JAC 2001. Seguiva incubazione con un anticorpo anti-fluorescina coniugato con perossidasi e successivamente l'aggiunta del substrato o-fenildiammina (OPD). La presenza di reazione positiva è stata rilevata tramite lettura con spettrofotometro a 480nm.

Tutti i ceppi caratterizzati da fenotipo MLS_B sono risultati positivi per la sonda *ermB* ed i ceppi con fenotipo M per la sonda *mefA*.

Il metodo descritto permette di standardizzare l'analisi di un grande numero di campioni e la discriminazione tra più genotipi con una sola reazione di amplificazione del DNA. E' possibile analizzare simultaneamente un numero elevato di campioni (96 per piastra), in un tempo inferiore alle 4 ore e con risparmio economico rispetto ad altre metodiche molecolari. Inoltre, l'uso di oligonucleotidi come sonde aggiunge specificità e sensibilità al saggio, incrementando così l'attendibilità dei risultati.

METICILLINO RESISTENZA IN AMBITO OSPEDALIERO

Russo R., Grassi P., Grasso E., Trapanotto G., Mazzurco A., Sciacca A.

Laboratorio Analisi Azienda Policlinico Università Catania

Il diffondersi della meticillino resistenza tra i vari ceppi di Stafilococco, è ormai riconosciuta come un'emergenza a livello mondiale soprattutto in ambito ospedaliero dove si assiste contemporaneamente a una multiresistenza verso altre molecole (macrolidi, aminoglicosidi, chinolonici)

Abbiamo voluto studiare retrospettivamente le resistenze agli antibiotici dei vari Stafilococchi isolati dal gennaio 2000 a giugno 2002 da esami colturali di materiali diversi (emocolture, escreti, urine, pus) provenienti dai pazienti ricoverati presso i reparti dell'Azienda Policlinico Università Catania. Per l'identificazione e antibiogramma sono state utilizzate le card VITEK BioMerieux

Gli Stafilococchi aurei presentano una costante resistenza alla metecillina nel 2000 del 34%; nel 2001 del 49% e nel primo semestre del 2002 del 33%; nello stesso periodo si assiste invece ad un'aumento della resistenza alla gentamicina (24 - 32 - 68%), ad una riduzione della resistenza alla ciprofloxacina (88 - 84 - 73%), al cotrimoxazolo (71 - 71 - 51%), all'eritromicina (66 - 58 - 45%) e alla clindamicina (61 - 39 - 23%).

Gli Stafilococchi coagulasi negativi presentano alte % di resistenza alla oxacillina (68-73-77%), una lieve riduzione della resistenza alla ciprofloxacina (77-74-61%), al cotrimoxazolo (68-61-52%) e alla clindamicina (68-61-35%), mentre risulta costante la resistenza alla gentamicina (56-61-58%). Si sono riscontrati rari ceppi resistenti alla teicoplanina (2-6%) mentre nessuna resistenza è stata segnalata alla vancomicina nonostante l'utilizzo nei vari reparti di questo farmaco.

I nostri dati concordano con quelli riscontrati in altri ospedali italiani e stranieri, oggi abbiamo a disposizione un gran numero di antibiotici che non è però sufficiente a trattare tutte le infezioni. Infatti la terapia antibiotica ha selezionato ceppi altamente resistenti e ciò comporta insuccessi terapeutici in pazienti particolarmente a rischio di infezioni con la possibilità di diffondere fuori dall'ambiente ospedaliero i fattori di resistenza.

MONITORAGGIO DELLE INFEZIONI DA CYTOMEGALOVIRUS IN SOGGETTI IMMUNOCOMPROMESSI

Rosalia Graffeo, Stefania Manzara, Simona Marchetti, Stefania Ranno, Paola Cattani e Giovanni Fadda

Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Il Citomegalovirus (CMV) è caratterizzato, come tutti i virus appartenenti alla famiglia degli *Herpesviridae*, dalla capacità di stabilire infezioni latenti che possono andar incontro a riattivazioni soprattutto in particolari condizioni cliniche. L'infezione da CMV è un'importante causa di morbilità e mortalità nei soggetti immunodepressi.

Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la presenza di un'infezione attiva da CMV analizzando 70 campioni di sangue provenienti da pazienti ricoverati presso i reparti di Ematologia e Trapianti d'Organo del Policlinico "A. Gemelli" dell'Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma. A tale fine sono state utilizzate tre metodiche diagnostiche: la ricerca di antigeni virali (pp65) nel sangue periferico (antigenemia per CMV), una PCR qualitativa e la Real-Time PCR.

Su 34 dei 70 campioni raccolti è stato possibile eseguire l'antigenemia per CMV che è risultata positiva nel 17.7% dei casi. Gli stessi 34 campioni, previa estrazione del DNA totale, esaminati con la Real-Time PCR sono risultati positivi nel 38.6% dei casi. Per i restanti 36 campioni, con un numero di cellule insufficiente per eseguire l'antigenemia, la Real-Time PCR è stata valutata in confronto con una PCR qualitativa eseguita su plasma e la sensibilità delle due metodiche è risultata sovrapponibile (38.6% di positivi con la Real-Time e il 33.4% con la PCR qualitativa).

I risultati ottenuti mostrano che la metodica molecolare della Real-Time PCR può essere una valida alternativa sia all'antigenemia, soprattutto per i campioni con un numero insufficiente di polimorfonucleati frequenti nei pazienti immunocompromessi, sia ad una PCR qualitativa, con il vantaggio di poter avere un risultato quantitativo, particolarmente utile per il monitoraggio delle infezioni attive e per l'eventuale controllo della risposta ad una terapia antivirale specifica.

MONITORAGGIO DI MICETI E BATTERI AERODISPERSI IN AMBIENTI DI LAVORO E STUDIO E VALUTAZIONE DEI RISCHI PER LA SALUTE

V. Tullio, A.M. Cuffini, G.Banche, J.Roana, N.Mandras e N.A. Carlone
Dipartimento di Sanità Pubblica e di Microbiologia-Università di Torino

Gli ambienti di lavoro e di studio sono caratterizzati da inquinamento ambientale da bioaerosol determinato in parte dalla presenza di materiali da costruzione ed arredo (suppellettili, scaffalature, tappezzerie, ecc.) e di impianti di condizionamento. La presenza, inoltre, di un numero elevato di persone può contribuire ad aumentare la contaminazione microbiologica in seguito ad emissioni di agenti potenzialmente infettivi presenti su peli, capelli o emessi tramite saliva, starnuti o tosse. Considerato che le problematiche relative alla contaminazione biologica dell'aria sono ancora sottovalutate in Italia, appare evidente l'importanza di stabilire l'entità della contaminazione fungina e batterica eventualmente presente in questo tipo di ambienti confinati. La valutazione della carica microbica è stata eseguita in ambienti caratterizzati da diverso afflusso umano (Dipartimento Universitario e Scuola Media Inferiore), entrambi collocati nella periferia della città di Torino, costeggiati da zone di verde e da corsi d'acqua. I prelievi sono stati effettuati aspirando volumi d'aria noti con il collettore volumetrico portatile a piastra forellata S.A.S, utilizzando piastre RODAC contenenti Plate Count Agar per i batteri e Sabouraud Dextrose Agar per i funghi. La corrente di aspirazione è stata impostata a 600 litri/min per i batteri e a 200 litri/min per i funghi. Le piastre sono state incubate a 37°C per 24-48 ore per i batteri e a 25°C per 3-5 giorni per i funghi.

In entrambi gli ambienti esaminati sono stati riscontrati, tra i batteri, bacilli e cocchi Gram positivi (*Staphylococcus spp.* e *Micrococcus spp.*), mentre tra i funghi soprattutto penicilli e demaziacei (*Cladosporium spp.* e *Alternaria spp.*). Nel Dip. Universitario sono stati isolati anche degli zigomiceti (*Mucor spp.*).

I valori di concentrazione microbiologica riscontrati nel corso dell'indagine sono in sostanziale accordo con le linee guida della Comunità Scientifica Internazionale secondo le quali il limite accettabile per i batteri è di 500 UFC/m³ e per le muffe di 300 UFC/m³. Tutti gli ambienti esaminati, quindi, siano essi caratterizzati da elevata presenza umana (aule, laboratori, palestre) o siano occupati da personale lavorativo per 8 ore/die, possono essere considerati non a rischio per la salute umana, anche se alcuni miceti riscontrati (*Alternaria*, *Mucor*, *Aspergillus*) meritano particolare attenzione perché spesso associati ad infezioni nei pazienti immunocompromessi.

MOSAICISMO DELLO SPACER E LOCALIZZAZIONE DEGLI OPERONI RIBOSOMIALI IN *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Gianninò V., Guardo, G., La Terra, K., Santagati, M., Cascone C. e Stefani S.
Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Ginecologiche – Università di Catania

I geni rDNA sono altamente conservati in tutto il mondo microbico: specie batteriche correlate mostrano una maggiore similarità in questi geni rispetto a specie più distanti, pertanto sono da tempo oggetto di studi filogenetici e tassonomici. In particolare, la caratterizzazione del 16S rDNA è un metodo standard per l'identificazione di specie, generi e famiglie. Negli Eubatteri, i geni ribosomiali sono organizzati in un operone, presente in copie multiple (alleli) nel cromosoma, ed il cui numero varia tra i diversi generi. Ogni operone è costituito da un promotore seguito dalle sequenze codificanti le tre specie di rRNA, 16S-23S-5S, separate tra loro da regioni non codificanti dette spacer: queste regioni, in particolare lo spacer 16S-23S, sono considerate largamente non funzionali e sottoposte a minima pressione selettiva, mutano in modo casuale e molto rapidamente nel tempo e mostrano una variabilità tale da essere utili in studi di identificazione e tipizzazione batterica. Inoltre, il fatto che la maggior parte delle specie batteriche possiede molteplici copie degli operoni *rrn* potrebbe apportare un ulteriore livello di variabilità in queste regioni, anche tra diversi alleli di una data specie.

Il lavoro descrive la determinazione del numero di operoni ribosomiali e della loro localizzazione in *Streptococcus pneumoniae* mediante PFGE dopo restrizione con I-Ceu I e la caratterizzazione della struttura molecolare dello spacer ribosomiale 16S-23S amplificato tramite PCR-ribotipo e sottoposto a sequenziamento. L'analisi tramite PFGE ha evidenziato la presenza di 4 operoni *rrn* in *S. pneumoniae*, tre dei quali associati ed uno indipendente rispetto agli altri. In tutti i ceppi di *S. pneumoniae* inclusi nello studio si evidenzia la presenza di un singolo allele dello spacer 16S-23S delle dimensioni di 241 bp. L'analisi della sequenza mette in evidenza una organizzazione a mosaico di blocchi di sequenza, in parte sovrapposti, presenti nelle corrispondenti regioni spacer di diverse specie di *Streptococcus*, e la totale assenza di sequenze specie-specifiche. In generale, la struttura a mosaico è caratteristica di microrganismi con un alto tasso di trasformazione naturale ed è indice di acquisizione orizzontale di tratti genici da microrganismi più o meno correlati. Nel caso di *S. pneumoniae* la sequenza spacer è conservata intra ed inter-specie, non è utilizzabile per scopi di tipizzazione, e l'organizzazione a mosaico non lascia spazio a fenomeni di variabilità.

MOTILITÀ SWARMING IN *BACILLUS SUBTILIS*

F. Celandroni, E. Ghelardi, E. Parisio, S. Salvetti, A. Galizzi*, S. Senesi

Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotechnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, Università degli Studi di Pisa e *Dipartimento di Genetica e Microbiologia A. Buzzati-Traverso, Università degli Studi di Pavia

La motilità *swarming* è una forma di differenziamento indotta dal contatto con substrati solidi in eubatteri flagellati. E' caratterizzata dalla produzione di cellule lunghe, iperflagellate e multinucleate, le cellule *swarm*, che possiedono la proprietà di muoversi in gruppi coordinati colonizzando rapidamente la superficie disponibile. La motilità *swarming* è stata studiata prevalentemente nei batteri Gram-negativi, per i quali è dimostrato che mutazioni in geni dell'operone *che/fla* aboliscono il differenziamento delle cellule *swarm*. Poco noti sono i componenti molecolari coinvolti nel differenziamento *swarming* dei Gram-positivi e limitati al ruolo di *fliY* in *Bacillus cereus* (1) e di *flhA* in *B. thuringiensis* (2). La motilità *swarming* non è mai stata studiata in *B. subtilis*, nonostante questo microrganismo costituisca un modello per lo studio della motilità flagello-mediata. Nel presente studio, viene dimostrata la capacità di differenziamento *swarming* nel ceppo PB5249 di *B. subtilis*, derivato dal PB1831 per una mutazione nel locus *ifm*, che produce un fenotipo ipermobile nel ceppo PB5249 quando fatto crescere in terreno liquido. La crescita su terreno solido dei due ceppi ha dimostrato, infatti, che: (i) le colonie prodotte dal ceppo PB1831, fortemente rugose e con margini irregolari, risultavano omogeneamente costituite da cellule che, disposte in lunghe catene, avevano dimensioni simili a quelle delle cellule prelevate da terreno liquido, e, contrariamente a queste ultime, risultano prive di flagelli; (ii) le colonie prodotte dal ceppo PB5249, caratterizzate da un aspetto a "terrazze" e con margini regolari, erano costituite sia da cellule *swarm*, lunghe ed iperflagellate, disposte alla periferia della colonia, sia da cellule non differenziate all'interno della stessa. I risultati ottenuti suggeriscono che la motilità *swarming* in *B. subtilis* sia sotto il controllo del locus *ifm* e la sua analisi funzionale, attualmente in corso, contribuirà a chiarirne il ruolo nel differenziamento *swarming* indotto dal contatto delle cellule in crescita su superfici solide.

(1) S. Senesi, F. Celandroni, S. Salvetti, D.J. Beecher, A.C.L. Wong, E. Ghelardi. *Microbiology*, 148:1785-94, 2002

(2) E. Ghelardi, F. Celandroni, S. Salvetti, D.J. Beecher, M. Gominet, D. Lereclus, A.C.L. Wong, S. Senesi. *J. Bacteriol.* (in corso di stampa).

MYCOPLASMA PNEUMONIAE ED INFEZIONI RESPIRATORIE PRESSO IL DIPARTIMENTO DI PEDIATRIA DELL'UNIVERSITÀ DI CATANIA

R.Garozzo, P.Grassi*, R.Dinaro, A.Lombardo*, A.Sorge, A.Sciacca*,

Dipartimento di Pediatria Università

Laboratorio Analisi Azienda Policlinico

Il capitolo delle infezioni respiratorie è forse il capitolo più importante dell'infettivologia pediatrica. In quanto, se la terapia antibiotica, viene instaurata precocemente e soprattutto se mirata può ridurre in modo drastico la morbilità e la mortalità. Sappiamo anche che i patogeni più comuni in età pediatrica responsabili di patologie delle alte e basse vie respiratorie sono lo *Streptococcus pneumoniae* e l'*Haemophilus influenzae*, ma in questi ultimi anni sempre più presenti sono i cosiddetti patogeni atipici fra questi il *Mycoplasma pneumoniae* è il più frequente. È caratterizzato dall'assenza di parete cellulare e per questo viene definito atipico, e da una membrana di natura lipoproteica che avvolge il microrganismo e, aderendo alla parete cellulare dell'ospite gli permette di penetrare dentro la cellula. Altra caratteristica di questo microrganismo è la mancata risposta ai comuni antibiotici, da qui la necessità di una diagnosi precoce per poter intraprendere un trattamento terapeutico quanto più corretto possibile. I macrolidi sono tra i pochi agenti efficaci contro questi patogeni atipici, danno una guarigione clinica anche dopo pochi giorni di terapia. Sono invece necessari trattamenti prolungati per l'eradicazione dell'infezione. E' noto infatti da tempo come vi sia una correlazione tra infezione da *Mycoplasma pneumoniae* ed asma bronchiale. Presso il Dipartimento di Pediatria dell'Università di Catania nel corso dell'anno 2001 è stato condotto uno studio sulle infezioni respiratorie (alte e basse vie respiratorie) legate al *Mycoplasma pneumoniae*. Sono stati esaminati 580 soggetti venuti alla nostra osservazione per patologie inerenti flogosi delle vie respiratorie. Abbiamo trovato 30 pazienti positivi per *Mycoplasma pneumoniae*, sette avevano una età inferiore a 4 anni, dieci una età compresa fra 4 e 7 anni, tredici erano fra i 7 e 12 anni. Tutti presentavano i segni clinici (tosse e febbre), gli indici di flogosi erano aumentati e presentavano una positività degli anticorpi anti-mycoplasma (da 1/40 a 1/1280). In sette pazienti erano presenti anche le agglutinine a freddo e venti avevano alla radiografia del torace una zona di opacità polmonare. I nostri dati concordano con quelli riscontrati in altre regioni d'Italia. Tutti i nostri pazienti sono stati trattati con macrolidi per almeno quindici giorni per ottenere non solo la guarigione clinica ma soprattutto per avere l'eradicazione dell'infezione onde evitare le recidive.

NUOVO SAGGIO MOLECOLARE “MALARIA IBRIDOGEN” PER LA DIAGNOSI DI MALARIA: VALUTAZIONE PRELIMINARE

Calderaro A., Dettori G., Piccolo G., Bommezzadri S., Ragni P., Zuelli C., Manca N.¹, Perandin F.¹, Ricci L.², Arcangeletti M.C., Medici M.C., Chezzi C.

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio-Sezione di Microbiologia, Università di Parma; ¹Istituto di Microbiologia Spedali Civili, Università di Brescia; ²Arcispedale S. Maria Nuova, Centrale Operativa, Reggio Emilia.

L'esame microscopico è da sempre il metodo di riferimento per la diagnosi di laboratorio di malaria, ma presenta limiti come scarsa sensibilità nei casi di bassa parassitemia e difficoltà nell'identificare plasmodi in casi di infezioni miste. Saggi di amplificazione genica (PCR) si sono rivelati più sensibili e specifici, ma non sono standardizzati e automatizzati, sono di complessa e lunga esecuzione. Allo scopo di ovviare ai limiti della PCR descritta da Snounou et al., attualmente in uso nel nostro laboratorio, abbiamo iniziato a valutare un nuovo saggio molecolare “Malaria Ibridogen” (Amplimedical S.p.A.) per l'amplificazione e la rivelazione del DNA dei quattro plasmodi di interesse medico.

Campioni di sangue ottenuti da pazienti con sospetta malaria sono stati sottoposti ad osservazione microscopica, saggio immunocromatografico (ICT malaria Pf/Pv) e ad estrazione del DNA da sottoporre a nested-PCR. Aliquote di DNA estratto sono state sottoposte a PCR genere-specifica per l'amplificazione di una sequenza presente nel DNA 18S dei plasmodi, mediante il saggio pronto all'uso “Malaria Ibridogen”. Successivamente, ogni prodotto di amplificazione è stato visualizzato sia in gel di agarosio, sia sottoposto ad ibridazione in micropiastra con una sonda genere specifica e quattro sonde specifiche per i 4 plasmodi di interesse medico. Il saggio “Malaria Ibridogen” prevede anche l'impiego di un sistema di controllo della presenza di inibitori nella reazione di PCR mediante l'aggiunta dei “primers” che amplificano un frammento del gene della β -globina presente nel DNA estratto da campioni cellulari. L'amplificato è stato rivelato in micropiastra mediante ibridazione con una sonda specifica per il gene umano della β -globina.

I risultati preliminari fino ad ora ottenuti appaiono soddisfacenti e indicano che la PCR genere-specifica amplifica efficacemente il DNA dei quattro plasmodi di interesse medico; le quattro sonde specifiche rispettivamente per *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* ha confermato i risultati ottenuti mediante la PCR descritta da Snounou et al., tranne in 2 casi in cui il saggio “Malaria Ibridogen” non ha consentito di differenziare un'unica specie.

POLIOMAVIRUS UMANO BK E CISTITE EMORRAGICA.

Pietro Paolo V.*, Fioriti D.*, Videtta M.*, Mischitelli M.*, Sica S.^\, Chiusolo P.^\, Sorà F.^\ e Degener A.M.^\circ

**Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica e ^Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia, Università “La Sapienza”, Roma; ^ Istituto di Semeiotica Medica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma.*

Le infezioni da poliomavirus BK (BKV) nonché da Adenovirus rappresentano una complicanza in corso di trapianto di cellule staminali in particolare dopo trapianto allogenico. Il virus BK è stato ritenuto responsabile nella genesi della cistite emorragica post trapianto, in quanto, alla fine degli anni '80 esso fu isolato dalle urine di pazienti con tale patologia. La cistite emorragica determina un sanguinamento clinicamente rilevante dovuto ad un coinvolgimento massivo della mucosa vescicale. Tale complicanza si verifica spesso tardivamente, circa 60-90 giorni dal trapianto, durante la terapia immunosoppressiva con ciclosporina A.

Il ruolo della terapia antivirale è legato ad una diagnosi microbiologica sicura per la ricerca di BKV, nonché di Citomegalovirus e di Adenovirus.

Sulla base di quanto premesso, lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'incidenza di cistite emorragica post-trapianto di cellule staminali in una coorte di pazienti sottoposti consecutivamente a tale procedura, di valutare l'eziologia, la risposta al trattamento di tipo sia supportivo che eziologico e la presenza di fattori di rischio per lo sviluppo di tale complicanza.

Alla comparsa della cistite emorragica, un campione di urine del paziente veniva analizzato per la presenza di Adenovirus e BKV utilizzando metodiche di PCR.

La presenza di sequenze di DNA di BKV è stata ricercata utilizzando due diverse PCR (una per l'amplificazione della regione regolatrice e l'altra della proteina capsidica VP1). La presenza di sequenze di DNA di Adenovirus è stata ricercata utilizzando PCR per la regione codificante l'esone.

Nella nostra casistica la percentuale di isolamento di Adenovirus in corso di cistite emorragica è risultata pari a zero, mentre il prodotto di amplificazione di BKV è stato ritrovato nel 10.4% dei casi.

I prodotti di amplificazione della regione regolatrice e della VP1 di BKV, ottenuti dalle urine dei vari soggetti, sono stati sottoposti a sequenziamento e/o RFLP. I ceppi ritrovati nei campioni in esame appartengono tutti al sottotipo I con una regione regolatrice senza variazioni di rilievo rispetto all'archetipo.

In due casi, trattati con cidofovir e ribavirina, abbiamo ottenuto la regressione della cistite e la negatività della ricerca del genoma virale di BKV nelle urine dopo 12 e 60 giorni dall'inizio della terapia.

POLIPOSI NASALE: CORRELAZIONE TRA POPOLAZIONE MICROBICA ED ESPRESSIONE CITOCHINICA LOCALE.

M. Vitali¹, A. Nocentini¹, R. Scardazza², C. Simoncelli², L. Romani¹, F. Bistoni¹, L. Pitzurra

¹ Sezione Microbiologia. Dipartimento Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche.

² Sezione Otorinolaringologia. Dipartimento di Specialità Medico-Chirurgiche.

Università degli Studi di Perugia. Perugia. Italia.

La poliposi nasale è una condizione infiammatoria del naso e dei seni caratterizzata da una marcata infiltrazione di eosinofili, in aggiunta a linfociti, cellule dendritiche e macrofagi. Il reclutamento selettivo delle cellule infiammatorie è mediato da chemochine e citochine infiammatorie. Lo studio della correlazione tra infezione ed espressione citochinica locale è stato affrontato parzialmente solo in modelli sperimentali animali, ma non nell' uomo. A tale scopo è stata valutata la colonizzazione batterica e/o fungina e l'espressione di mRNA specifici per IL-10, IL-13 (citochine Th₂) ed IL-12 (citochina Th₁) in polipi nasali di pazienti sottoposti a polipectomia per ostruzione nasale.

Le indagini colturali per l'isolamento delle specie microbiche sono state eseguite mediante procedure standardizzate. La valutazione quantitativa dell'espressione di mRNA citochino-specifici è stata eseguita mediante real-time RT-PCR.

In sette polipi nasali (41% della popolazione allo studio) le indagini colturali hanno dato esito negativo; in 6 (35%) sono state isolate specie batteriche appartenenti ai generi *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* spp. e *Staphylococcus* spp.; in 4 (24%) sono state isolate specie fungine appartenenti ai generi *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp.. In tutti i campioni allo studio sono stati ottenuti livelli apprezzabili di mRNA specifici per IL-10, IL-13 ed IL-12. Inoltre, sono state osservate differenze significative nei livelli quantitativi delle citochine IL-10 ed IL-13, ma non nei livelli di IL-12. In particolare nei polipi nasali colonizzati da specie fungine, i livelli di mRNA specifici per IL-10 ed IL-13 erano significativamente superiori rispetto a quelli registrati nei polipi nasali colonizzati da specie batteriche o non infetti. I risultati ottenuti suggerirebbero che anche a livello di poliposi nasale, nell' uomo, esiste una correlazione tra infezione e risposta infiammatoria citochino-specifica. In particolare, come già documentato in altre distretti, anche a livello della mucosa nasale un' infezione fungina si traduce nell' aumento dei livelli di citochine, quali la IL-10 e la IL-13, responsabili dell' attivazione di linfociti Th₂. Sono in corso indagini istochimiche per valutare se le differenze osservate nell'espressione citochinica correlino con una diversa risposta infiammatoria a livello tissutale.

PRESENCE OF BACTERIOCINS IN BIFIDOBACTERIUM SPP. OF HUMAN ORIGINS

V. Ferrarini, L. Pasini, B. Biavati

Dista, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna, Italy

Bifidobacteria are one of the common bacteria of the intestinal tract and their presence are believed to contribute to human health and well being. The beneficial effects from consumption of these live cells were attributed to their ability to provide protection against enteric pathogens, supplying enzymes to help in metabolizing some food nutrients and stimulating intestinal immune system. Many studies have reported that strains of beneficial intestinal bacteria produce metabolites that are active against many Gram positive and Gram negative bacteria. Some of these are called bacteriocins and they are defined as substances that exhibit bactericidal activity towards closely related species. They are particular interest specially for their potential application as natural preservatives in foods. Moreover, the production of these molecules by intestinal bacteria may play an important role in the competition in an environment of great abundance and complexity of microorganisms.

The aim of our research was the selection of bifidobacterial species that can produce bacteriocins. We use two different methods to test strains of 5 *Bifidobacterium* spp.: "Agar spot method" and "Well diffusion assay".

These methods were used to determine the antimicrobial activity of freeze-dried and crude bacteriocins against several food spoilage bacteria and food borne pathogens as indicators strains (for example *E. coli*, *B. subtilis*, *Salmonella enteritidis*). To determine the proteinaceous nature of the antimicrobial substance, the effect of pronase on the inhibitory activity was tested. Also the heat treatment was tested.

We found 4 strains of different species (*B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. pseudocatenulatum* and *B. breve*) that can inhibit the growth of the indicators used.

PRESENZA DI ANTICORPI ANTI-BORRELIA BURGDORFERI E ANTI-EHRLICHIA PHAGOCYTOPHILA IN SOGGETTI PROFESSIONALMENTE ESPOSTI ALLA PUNTURA DI ZECCA OPERANTI IN ABRUZZO, CAMPANIA, LAZIO, E SICILIA

Santino I^{1*}, Cammarata E², Franco S², Galdiero F³, Oliva B⁴, Sessa R¹, Tempera G², del Piano M¹

¹Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, Università "La Sapienza" di Roma

²Dipartimento di Scienze Microbiologiche, Università degli Studi di Catania

³Istituto di Microbiologia, II Università degli Studi di Napoli

⁴Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi dell'Aquila

La zecca *Ixodes ricinus*, largamente diffusa nel territorio italiano, è il principale vettore della malattia di Lyme (ML) e della Ehrlichiosi granulocitica umana (HGE).

La ML, causata da spirochete appartenenti al complesso *Borrelia burgdorferi* s.l., è oggi la malattia da zecca più frequentemente diagnosticata negli Stati Uniti e in Europa. In Italia il maggior numero di casi è stato registrato in Liguria, Friuli-Venezia Giulia, Trentino-Alto-Adige, Veneto, Emilia-Romagna, mentre casi sporadici sono stati segnalati nell'Italia centro-meridionale.

La HGE è causata da una *Ehrlichia* HGE agent attualmente denominata *Anaplasma phagocytophila*. In Europa il primo caso di HGE è stato descritto in Slovenia nel 1997 e fino ad oggi, in Italia, non sono stati notificati al Ministero della Sanità casi di ehrlichiosi; d'altra parte la presenza dell'infezione da HGE agent in *I. ricinus* è stata dimostrata nell'Italia centrale e settentrionale ed inoltre studi epidemiologici hanno dimostrato positività per anticorpi anti-*E. phagocytophila* in soggetti a rischio nelle zone alpine e in un gruppo di pazienti con borreliosi di Lyme nel Lazio.

Al fine di verificare la circolazione di *B. burgdorferi* e di *Ehrlichia* nell'Italia centro-meridionale stiamo determinando, con una indagine multicentrica, la sieroprevalenza di anticorpi anti-*B. burgdorferi* e anti-*E. phagocytophila* in lavoratori professionalmente esposti alla puntura di zecca, operanti nelle regioni Abruzzo, Campania, Lazio e Sicilia.

A tutt'oggi sono stati analizzati 712 campioni di siero di cui 387 sono di lavoratori a rischio e 325 di individui non esposti alla puntura di zecca ma residenti nelle stesse località del gruppo a rischio. Tutti gli individui esaminati hanno compilato un questionario clinico-anamnestico per la raccolta dei dati riguardanti il tipo di lavoro svolto, il ricordo di punture di zecche e l'osservazione di eventuali segni e sintomi di malattia di Lyme e di HGE.

Per la ricerca degli anticorpi anti-*B. burgdorferi* è stato utilizzato un test Elisa, per la ricerca degli anticorpi anti-*E. phagocytophila* un test di immunofluorescenza.

Il nostro studio ha evidenziato nella categoria a rischio una sieroprevalenza più alta, 6,4%, rispetto alla popolazione di controllo, 1,2%, per quanto riguarda la positività per anticorpi anti-*B. burgdorferi* e per la positività per anticorpi anti-*E. phagocytophila* 2,5% vs 0,6%.

PRESENZA DI PIU' SPECIE DI BRACHYSPIRE NELLE FECI DI SINGOLI SUINI ALLEVATI IN ITALIA.

Calderaro A., Dettori G., Piccolo G., Bommezzadri S., Ragni P., Conter M.¹, Zuelli C., Guégan R., Giordano R., Merialdi G²., Bonilauri P.², Perini S.², 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; ²Istituto Zooprofilattico, Reggio Emilia.

La compresenza delle spirochete patogene *B. pilosicoli* e *B. hyodysenteriae* viene definita coinfezione. La coinfezione in suini è stata fino ad ora suggerita mediante analisi fenotipica delle spirochete. Scopo di questo studio è valutare il saggio RFLP-PCR nel rivelare la presenza di coinfezioni utilizzando un modello sperimentale costituito da campioni preparati mescolando ampliconi di ceppi di specie diverse e saggiando campioni di feci ottenuti da suini.

Gli ampliconi di ceppi di riferimento e gli ampliconi di DNA estratto da campioni di feci sono stati sottoposti a RFLP con 4 diverse endonucleasi. Gli ampliconi di ceppi di riferimento saggiati singolarmente sono stati utilizzati come controllo dei pannelli di restrizione. I frammenti di restrizione sono stati separati mediante elettroforesi. Inoltre, i DNA sono stati saggiati con 3 diverse PCR specie-specifiche per *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* e *B. innocens/murdochii*.

L'RFLP di ceppi di riferimento opportunamente mescolati ha confermato che è possibile individuare la compresenza di *B. pilosicoli* + *B. hyodysenteriae*. Nei campioni animali è stata dimostrata la presenza di più di una specie di brachyspire: *B. pilosicoli* + *B. murdochii*, *B. murdochii* + il gruppo di specie *B. hyodysenteriae*/*B. intermedia*, *B. pilosicoli* + *B. murdochii* + il gruppo di specie *B. hyodysenteriae*/*B. intermedia*, mentre non erano presenti coinfezioni da *B. pilosicoli*+*B. hyodysenteriae*. I risultati ottenuti sono stati supportati dall'osservazione in piastra di colonie di morfologia simile, ma con diversa β -emolisi, sia di tipo forte che debole nella stessa coltura e pannelli biochimici atipici compatibili per la presenza di più di una specie di spirocheta. La presenza di più specie di brachyspire non è stata rivelata utilizzando le 3 PCR specie-specifiche.

I risultati dimostrano che nei campioni suini non erano presenti coinfezioni *B. pilosicoli*+*B. hyodysenteriae*, ma erano presenti altre combinazioni di differenti specie. La metodica RFLP-PCR è utile per la rivelazione di più specie di *Brachyspira* nello stesso campione animale e potrebbe essere applicata sia in diagnostica su campioni di origine umana e animale sia a scopo epidemiologico.

PREVALENZA DI METALLO-BETA-LATTAMASI IN ISOLATI CLINICI DI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

Francesco LUZZARO¹, Jean-Denis DOCQUIER², Claudia MUGNAIOLI², Andrea ENDIMIANI¹, Gianfranco AMI-COSANTE³, Gian Maria ROSSOLINI², Antonio TONIOLO¹.

1Università dell'Insubria e Ospedale di Circolo, Varese; 2Università di Siena, Siena; 3Università di L'Aquila, L'Aquila.

Le metallo-beta-lattamasi (MBL) sono enzimi della classe B di Ambler codificati su plasmidi o sul cromosoma. Le MBL possono idrolizzare un'ampia gamma di beta-lattamici tra i quali i carbapenemici. Nei primi anni '90 sono stati segnalati in Giappone ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* MBL-positivi responsabili di epidemie nosocomiali. Più di recente, anche nel nostro Ospedale abbiamo isolato batteri MBL-positivi. Con questo studio ci siamo proposti di stimare la prevalenza dei ceppi MBL-positivi tra gli isolati di *P. aeruginosa* che hanno provocato infezioni nosocomiali nel nostro Ospedale e di identificare i tipi di MBL prodotti. Nel 2001 abbiamo studiato 506 isolati non replicati di *P. aeruginosa*: 82 hanno dimostrato gradi diversi di resistenza ai carbapenemici e/o al ceftazidime. Su questi isolati abbiamo valutato in via preliminare la produzione di MBL mediante l'Etest MBL (AB Biodisk, Solna, Svezia) e con un test in microdiluzione che misura la MIC verso l'imipenem e verso l'imipenem addizionato di chelanti di ioni metallici (EDTA e o-fenantroline). La produzione di MBL è stata confermata con saggi specifici dell'attività enzimatica. I geni che codificano per le MBL sono stati ricercati mediante ibridazione su filtro con sonde di DNA specifiche per i geni *bla_{IMP}* e *bla_{VIM}*. Nel complesso abbiamo identificato 4 isolati (ottenuti da pazienti diversi ricoverati in reparti diversi) dotati del gene *bla_{VIM}* che producevano un enzima di tipo VIM. I risultati indicano che la prevalenza nel nostro Ospedale di ceppi di *P. aeruginosa* MBL-positivi è bassa (meno dell'1%), ma non estremamente rara. Nel corso dello studio abbiamo riscontrato sporadicamente eventi infettivi causati da batteri MBL-positivi diversi da *P. aeruginosa*. Di alcuni rari casi è risultato responsabile *P. putida*.

PREVALENZA DI RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI E SIEROTIPI IN CEPPI DI *S.PNEUMONIAE* ISOLATI NEL NORD ITALIA: RISULTATI DELLO STUDIO S.E.M.P.R.E. 2000-2002

Bozzolasco M*, A. Marchese, EA. Debbia, G.C. Schito

Sezione di Microbiologia C.A. Romanzi, Università degli Studi di Genova

Il significativo aumento della resistenza agli antibiotici in *S. pneumoniae*, documentato in varie parti del mondo, e il possibile impiego della profilassi vaccinale richiedono costanti sistemi di sorveglianza sia della sensibilità agli antibiotici sia dei sierotipi circolanti nel nostro paese. Lo studio S.E.M.P.R.E. ha assolto questo compito dal 2000 al 2002. Al progetto hanno partecipato 20 centri dislocati sull'intero territorio nazionale. Al Nord 7 centri hanno raccolto in totale 549 ceppi di *S. pneumoniae*, di cui 176, 174 e 199 rispettivamente nel 2000, 2001 e 2002. Il centro di Genova, ha determinato l'attività *in vitro*, espressa in termini di minima concentrazione inibente, mediante la tecnica della microdiluzione in brodo (NCCLS 2002), di penicillina, amoxicillina, amoxicillina/clavulanato, cefaclor (cefuroxime nel 2000), claritromicina (eritromicina nel 2000), levofloxacina, ciprofloxacina, rifampicina e tetraciclina e ha sierotipizzato i ceppi mediante la reazione di rigonfiamento capsulare. Considerando i farmaci dotati di "breakpoint" specifico, rifampicina (99.8% di ceppi sensibili), levofloxacina, amoxicillina con o senza acido clavulanico (98.9%) sono risultate le molecole più attive sull'intera collezione di pneumococchi, seguite da: cefuroxime (93.7%), penicillina (86.3%), cefaclor (81.5%), tetraciclina (75.6%), macrolidi (66.6%). Nei tre anni è aumentata la resistenza a diversi antibiotici: penicillina (dal 11.3% al 18.6%), macrolidi (dal 30% nel 2000 al 37.7% nel 2002), tetraciclina (dal 22% al 28.6%). I sierotipi più diffusi sono risultati: 3 (11.8%), 23 F (10.6%), 14 (8.4%), 19 F (8.2%), 19 A (7.5%), 6 B (7.3%), 6 A (7.1%), 9 L (3%), 18 C (2.4%). La sierotipizzazione di 10 ceppi isolati nel 2002 è ancora in corso. Nei tre anni sono state osservate alcune variazioni nella prevalenza dei sierotipi più diffusi: diminuzione per il 23 F (dal 13% nel 2000 al 9% nel 2002) e il 18 C (da 6.2% a 0%), e aumento per il 3 (dal 7.9% al 15.6%) e il 9 L (da 1.1% al 5%).

Nel Nord Italia, per la prima volta dal 1993 ad oggi, è stata ampiamente superata la soglia del 10% di penicillino-resistenza e quest'area si conferma ancora caratterizzata da un alto tasso di refrattarietà ai macrolidi. Levofloxacina risulta attiva su circa il 99% dei ceppi, indipendentemente dai meccanismi di resistenza da questi posseduti.

PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI RICOMBINANTI MURINI PER LA DIAGNOSI DI INFEZIONE PRODUTTIVA DA HHV8

Desogus A.^{1, 3}, Bugli F.², Cattani P.², Torelli R.², Pompei R.^{1, 3} e Fadda G.²

¹Sezione di Microbiologia, Università di Cagliari

²Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del S. Cuore, Roma

³Consorzio Biotecne, Cagliari

L'HHV8 è un virus umano appartenente alla ampia famiglia degli *Herpesviridae*, sottofamiglia γ , genere *Rhadinovirus*. L'importanza di questo virus nell'uomo è data dal suo coinvolgimento nella patogenesi del sarcoma di Kaposi (KS).

Si è osservato, infatti, che in pazienti affetti da KS il virus HHV8 viene abitualmente ritrovato nel tessuto lesionale, nelle cellule B e nei monociti circolanti. La prima indicazione del coinvolgimento di tale agente nella patogenesi del KS, è stato proprio il rilevamento del suo DNA nei tessuti di KS, mediante PCR, in tutte le forme cliniche della malattia.

Vista la rilevanza clinica del KS e considerate le implicazioni epidemiologiche delle infezioni da HHV8, la diagnostica di laboratorio ha assunto negli ultimi anni notevole importanza. Sono state utilizzate molte tecniche di indagine fra cui la PCR e diverse tecniche sierologiche. La PCR ha permesso di evidenziare sequenze del virus in più del 90 % delle lesioni di sarcoma di Kaposi nonostante non sia in grado di distinguere l'infezione attiva (litica) da quella latente. Risultati più significativi sono stati ottenuti con l'utilizzo di PCR qualitativa o RT-PCR su specifici trascritti virali.

Al fine di poter ampliare le applicazioni diagnostiche di tipo sierologico per infezioni produttive da HHV8, ci siamo proposti di clonare frammenti di anticorpi monoclonali murini diretti contro due proteine virali strutturali espresse durante la fase litica dell'infezione virale. Tali proteine, denominate p65 e K8.1, sono in grado di suscitare forti risposte anticorpali nei soggetti HHV8 positivi. Alcuni topi Balb-c sono stati immunizzati con le due proteine ricombinanti purificate, quindi si è proceduto all'isolamento dei linfociti della milza per l'estrazione del mRNA e alla successiva costruzione della genoteca murina sul vettore di esposizione fagica *pComb3*. Dopo 5 cicli di panning, si è eseguito lo *screening* in ELISA, per ciascuna proteina, di 40 cloni batterici produttori di Fab ricombinanti. I Fab reattivi ottenuti sono stati purificati e caratterizzati. Tali anticorpi potranno essere utilizzati, in metodiche semplici e con costi molto contenuti, nella diagnostica delle infezioni litiche da HHV8 o nelle fasi di riattivazione di infezioni latenti.

Finanziato dal Centro di programmazione della regione Sardegna

PRODUZIONE DI CHERATINASI IN UN CEPPINO DI *A. niger* RESPONSABILE DI ONICOMICOSI

Greco A.M.¹, Bevilacqua M.¹, Buscema M.¹ e S. Oliveri^{1,2}

¹Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche

²Laboratorio Analisi – Azienda Policlinico

Università di Catania

Gli studi sulla produzione e caratterizzazione di cheratinasi fungine sono stati condotti prevalentemente sui dermatofiti. Tuttavia tale attività proteolitica è stata evidenziata in altre specie di ifomiceti che svolgono l'importante ruolo di degradatori nel suolo. Relativamente al genere *Aspergillus* studi sono stati compiuti su *A. flavus* e *A. fumigatus*, ma nessun dato è stato fino ad oggi pubblicato su *A. niger*.

L'osservazione di un caso di onicomicosi da *A. niger* è stato lo spunto per indagare sulla possibile produzione di cheratinasi da parte di questa specie. L'indagine, oltre che sul ceppo isolato, è stata effettuata sul ceppo di collezione NPFC 2022.

L'attività cheratinasica è stata valutata con il metodo di Apodaca e McKerrow (1) da noi modificato. L'attività enzimatica è stata valutata sia in fase stazionaria sia durante la fase di crescita miceliale, utilizzando due soluzioni tampone rispettivamente a pH 7,8 e 9,0 dal momento che a pH 5,6 non è stata evidenziata nessuna attività.

Dal micelio del ceppo isolato dall'unghia, ottenuto dopo 7 giorni di incubazione in Sabouraud, sostituendo il terreno di crescita con quello condizionante, è stata evidenziata una attività cheratinasica che si è mantenuta intorno alle 2 U/ml, con una punta massima di 5 U/ml ottenuta il 23° giorno nel terreno condizionante alla cheratina. L'attività media risulta più elevata per entrambi i terreni condizionanti utilizzati, cheratina e peptone, a pH 7,8. Sostituendo il terreno di crescita dopo 21 giorni, l'andamento della produzione di cheratinasi appare più omogeneo nelle diverse condizioni sperimentali, con un valore massimo di 7 U/ml in terreno alla cheratina e pH 7,8.

Il ceppo NPFC 2022, mostra un'attività costantemente inferiore a quella del ceppo isolato.

L'inoculo diretto dei conidi in terreno minimo alla cheratina evidenzia ulteriormente una maggiore attività del ceppo di *A. niger* isolato dall'unghia, con valori massimi di 8,9 U/ml e di 6,7 U/ml, osservati rispettivamente al 7° giorno in tampone a pH 7,8 e al 14° giorno in tampone a pH 9,0.

In conclusione possiamo affermare che l'azione patogena di *Aspergillus niger* isolato dall'unghia è verosimilmente supportata dalla produzione di cheratinasi.

(1) Apodaca G., McKerrow J.H. – Expression of proteolytic activity by cultures of *Trychophyton rubrum*. J. Med. Vet. Mycology, 1990, 28: 159-171.

PROPOSTA DI PROTOCOLLO DIAGNOSTICO NELLA TOXOPLASMOSI CONGENITA.

R. Garozzo*, R. Dinaro**, A. Sorge*, G. Costa*, V. Sardo***G. Scalia***.

*Dipartimento di Pediatria.

**Dottorato di ricerca Malattie genetiche dell'età evolutiva.

***Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Ginecologiche.

Il rischio che il Toxoplasma superi la barriera placentare è strettamente correlato all'epoca gestazionale in cui si verifica l'infezione materna. L'eventuale danno embrionale prodotto dall'infezione da Toxoplasma è elevato quando l'infezione avviene durante le prime settimane di gestazione, mentre nelle ultime settimane l'infezione fetale si esprime in forma subclinica.

L'infezione da Toxoplasma induce generalmente una risposta immunitaria caratterizzata dalla comparsa:

dopo circa una settimana di IgM

dopo una o due settimane di IgG

Un esame sierologico che riveli la presenza di anticorpi specifici anti-Toxoplasma in una donna gravida, precedentemente sieronegativa, è un sicuro indice di prima infezione in atto. In questo caso sarà necessario iniziare immediatamente un trattamento terapeutico con spiramicina, pirimetamina e sulfadiazina.

Presso il Day hospital del dipartimento di Pediatria vengono seguiti, dal mese di maggio 2000, circa 64 bambini figli di madre a cui è stata fatta diagnosi di Toxoplasmosi in gravidanza. Le donne sono state tutte trattate secondo il protocollo terapeutico nazionale che prevede l'uso dei tre farmaci sopracitati in periodi diversi della gravidanza. Sessantuno neonati sono risultati sempre IgM negativi e i valori delle IgG si sono gradualmente ridotti, fino alla totale scomparsa verso il primo anno di vita. Solamente tre neonati sono risultati IgM positivi e pertanto sottoposti a trattamento terapeutico con pirimetamina (1 mg/kg/die) e sulfadiazina (100 mg/kg/die).

Tutti questi soggetti sono stati sottoposti alla nascita a prelievo di sangue dal funicolo per analisi sierologica a cui è seguito un follow-up per il primo anno di vita che comprende:

- dosaggi anticorpali mensili;

ecografia cerebrale transfontanelle;

visita oculistica;

otoemissioni;

visita neurologica con valutazione dello sviluppo psicomotorio;

potenziali uditivi evocati;

valutazione neuropsichiatrica.

I neonati con diagnosi di infezione connatale da Toxoplasma devono essere trattati fin dalla nascita, per ridurre le gravi sequele a distanza della malattia.

Il protocollo terapeutico da noi utilizzato per trattare questi pazienti prevede oltre alla somministrazione di pirimetamina, sulfadiazina l'uso dell'acido folico in quanto i suddetti farmaci interferiscono con il metabolismo dell'acido folico.

REAL-TIME PCR E ALTRI METODI PER L'IDENTIFICAZIONE DI M. TUBERCULOSIS.

Ortu S., Molicotti P., Sechi L. A., Mura E., Saba F*, Peana N.**, Vertuccio A.***, Zanetti S.

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

* Clinica Malattie Infettive e Parassitarie, Università degli Studi di Sassari.

** Presidio Tisiopneumologico ASL N° 1, Distretto di Alghero (SS).

*** Divisione Pneumotisiologica, Osp. "C. Zonchello", ASL N° 3 (NU).

Nonostante le strategie sanitarie adottate negli ultimi decenni, la Tuberculosis continua a rappresentare la più frequente causa di morte provocata da una singola malattia infettiva.

Tutto ciò induce a mettere a punto sistemi di identificazione sempre più nuovi e sofisticati.

Del tutto recentemente, si sta rivelando di particolare interesse ai fini diagnostici, la Real-Time PCR, che permette sia un'analisi qualitativa che quantitativa di un segnale fluorescente prodotto proporzionalmente durante l'amplificazione di un prodotto di PCR.

Scopo del nostro studio è stato quello di confrontare la sensibilità e la specificità di questo nuovo sistema rispetto alla PCR tradizionale e con sistemi non molecolari (MGIT 9000).

Sono stati esaminati 36 campioni clinici di varia origine, 13 campioni di Espettorato, 5 campioni di Aspirato Gastrico, 6 campioni di Liquor, 3 campioni di Urine, 3 campioni di Liquido Pleurico, 2 Broncoaspirati, 1 campione di Cute, 1 campione di Sangue Midollare e 2 Linfonodi.

Dei campioni analizzati, 23 sono risultati positivi con la Real-Time PCR, 9 sono risultati positivi con la PCR tradizionale, 6 sono risultati positivi all'esame microscopico e 11 all'esame culturale (MGIT 9000).

I dati ottenuti da questi studi preliminari indicano che la Real-Time PCR dimostra ai fini diagnostici una maggiore sensibilità e rapidità.

RELAZIONE TRASCRIZIONALE TRA I GENI DELLA DIVISIONE CELLULARE *ftsA* E *ftsZ* E I GENI LOCALIZZATI NELLA REGIONE CROMOSOMICA ADIACENTE IN *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*.

M. C. Pischedda, D. Fadda, S. Petruzzelli, M.A. Marcialis e O. Massidda

Dip. Sc. Chirurgiche, sez. Microbiologia, Università di Cagliari

Nel corso dello studio del cluster della divisione cellulare (*dcw*) dello *Streptococcus pneumoniae* abbiamo identificato una regione cromosomica situata immediatamente a valle dei geni della divisione cellulare *ftsA* e *ftsZ*, i cui prodotti sono essenziali per il processo di citochinesi. Questa regione contiene un gene che codifica l'omologo del gene *divIVA* del *Bacillus subtilis*, coinvolto nella determinazione della specificità topologica del setto di divisione cellulare e inoltre 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*. Studi sulla presenza di questa regione in altri batteri, basati sulla comparazione delle sequenze, hanno evidenziato che essa è altamente conservata in tutti i batteri Gram-positivi, incluse le specie non strettamente correlate da un punto di vista evolutivo, ma non nei batteri Gram-negativi. Studi funzionali, ottenuti mediante l'inattivazione dei singoli geni e successiva analisi dei fenotipi mutanti mediante microscopia a contrasto di fase, colorazione del nucleoide e microscopia elettronica a scansione e a trasmissione, hanno dimostrato un ruolo di questi geni, precedentemente sconosciuti, nei processi morfogenetici, di divisione cellulare e/o segregazione del cromosoma.

Allo scopo di determinare se i geni localizzati nella regione cromosomica immediatamente adiacente al *dcw* cluster fossero anche trascritti insieme ai geni *ftsA* e *ftsZ*, come suggerito dalla loro posizione, dalla loro direzione di trascrizione e dall'analisi computazionale delle sequenze, abbiamo analizzato gli RNA messaggeri tramite RT-PCR e Northern-blot.

A questo scopo è stato estratto l'RNA totale dal ceppo di *S. pneumoniae* Rx1 in fase esponenziale ed è stato amplificato mediante RT-PCR, con primer specifici localizzati tra due geni adiacenti, o separatamente mediante elettroforesi in gel di agarosio denaturante per la successiva analisi con sonde specifiche.

I risultati ottenuti con entrambe le metodiche supportano l'ipotesi che questi geni siano trascritti, almeno in parte, con i geni *ftsA* e *ftsZ* e confermano un ruolo di questi geni nel processo di divisione cellulare.

RIARRANGIAMENTI DELLA REGIONE DI CONTROLLO DELLA TRASCRIZIONE DI VIRUS JC ISOLATO DA CAMPIONI DI LIQUOR.

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

*Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, **Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università "La Sapienza", Roma.

Il poliomavirus JC (JCV) è universalmente riconosciuto come l'agente eziologico della PML, una malattia demielinizzante del SNC, normalmente associata a immunodepressione e con maggior frequenza tra gli individui malati di AIDS. La sede primaria di latenza individuata per JCV è stato il rene, analogamente al poliomavirus BK.

In seguito ad alterazioni immunologiche dell'ospite, come ad esempio terapie immunosoppressive, trapianti di rene e di midollo osseo, nonché l'infezione da HIV, 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 di JCV (ceppo archetipo) può essere suddivisa in sei porzioni denominate box A (36 bp), B (23 bp), C (55 bp), D (66 bp); E (18 bp) e box F (69 bp), ognuna delle quali contiene siti di "binding" per fattori cellulari importanti per la trascrizione virale. Nostre ricerche precedenti hanno evidenziato nei PBMC di diversi soggetti con e senza PML la presenza di sequenze di JCV riarrangiate a livello della NCCR, indicando che in tali cellule possono verificarsi, a partire dall'archetipo, dei riarrangiamenti diversi, alcuni dei quali potrebbero essere importanti per la selezione di varianti più virulente ed adattabili a differenti tessuti. Abbiamo quindi analizzato la struttura della NCCR dei ceppi di JCV isolati da liquor di soggetti HIV-positivi e negativi, con e senza PML, allo scopo di verificare la presenza di varianti diverse di JCV 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 NCCR 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 tra i campioni provenienti da soggetti con e senza PML potrebbe essere determinante per l'emergere di un'organizzazione strutturale della NCCR del virus più adatta allo sviluppo nel tessuto nervoso.

RICERCA DI ENTEROCOCCHI NELLE ACQUE MEDIANTE PCR.

Signoretto C.^a, Burlacchini G.^a, Lleò M.M.^a, Pruzzo C.^b e Canepari P.^a

^aDipartimento di Patologia, Sezione di Microbiologia, Università di Verona e ^bIstituto di Microbiologia, Università di Ancona.

La presenza di enterococchi nelle acque fornisce una indicazione del grado di inquinamento fecale a medio termine. Da più parti, di recente, sono state mosse critiche sui metodi che vengono comunemente applicati per effettuare le ricerche. Si è dimostrato, infatti, che gli enterococchi, così come molti altri microrganismi di interesse medico, una volta che sono stati dispersi nelle acque, per effetto dell'oligotrofia e della temperatura sub-ottimale, attivano delle particolari strategie di sopravvivenza tra cui la adesione ad organismi dello zooplancton (principalmente copepodi) e lo stato vitale ma non coltivabile (VBNC) che li rende non più rilevabili con i tradizionali metodi colturali. In stato VBNC i batteri mantengono la patogenicità e la capacità di riattivarsi al ripristino di condizioni ambientali ottimali che possono essere ottenute, ad esempio, con l'ingestione da parte dell'uomo. Da ciò se ne consegue che i metodi che oggi sono comunemente utilizzati per esprimere un giudizio sulla qualità microbiologica delle acque potrebbero sottostimare la reale carica microbica in quanto non tengono conto dei batteri in stato VBNC e del fatto che essi possano essere concentrati dagli organismi zooplanctonici. Per verificare l'importanza di questi elementi si sono ricercati gli enterococchi sia liberi che adesi allo zooplancton mediante tecnica di amplificazione degli acidi nucleici (PCR) in campioni di acqua del Lago di Garda e campioni di acqua marina prelevata nella zona di Ancona, che erano risultati negativi applicando il metodo colturale. I risultati ottenuti hanno permesso di dimostrare che in almeno la metà dei campioni esaminati erano rilevabili le caratteristiche sequenze geniche di *Enterococcus faecalis*. Inoltre, il numero più elevato di positivi è stato riscontrato nei prelievi di zooplancton. Applicando un metodo di PCR di tipo competitivo con "Internal Standard", da noi messo a punto, si è anche calcolata la reale carica di enterococchi. Pertanto si può concludere che, sia nell'acqua del lago che in quella marina, gli enterococchi sono presenti in numero ben superiore a quanto fino ad ora è stato stimato e, soprattutto in forma adesa allo zooplancton. Questi risultati depongono a favore della necessità della revisione dei protocolli attualmente raccomandati per una più puntuale e realistica valutazione della qualità microbiologica delle acque per uso umano.

RICERCA DI MYCOBATTERI IN PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA

Grassi P., Sciuto C*, Grasso E, Russo R, Mazzurco A, Trapanotto G, Lombardo A, Sciacca A

Laboratorio Analisi Azienda Policlinico Università Catania

DH Pneumologia * Dipartimento Pediatria

Mycobacterium tuberculosis sta riproponendosi come patogeno in tutto il mondo e sicuramente le resistenze ai chemioterapici riscontrate hanno un ruolo preponderante nella sua persistenza e elevata contagiosità. Contemporaneamente vengono isolati con sempre maggiore frequenza micobatteri atipici, il cui significato di ritrovamento deve essere attentamente valutato da un punto di vista clinico. Popolazioni a rischio per patologie croniche o con immunodeficit registrano l'incidenza maggiore di tali patologie. Le indagini sierologiche sono state poco utilizzate; infatti la risposta immune è prevalentemente cellulare ma è presente anche una componente umorale con produzione di IgG, IgM e IgA rivolte verso antigeni specifici. Nei pazienti con fibrosi cistica che afferiscono al DH Pneumologia del Dipartimento di Pediatria di Catania abbiamo ricercato i micobatteri nell'escreato e gli anticorpi su siero. L'escreato, inviato immediatamente in laboratorio, è stato seminato su terreni selettivi e di arricchimento per la ricerca dei comuni patogeni. Il restante materiale è stato raccolto in provette, neutralizzato e fluidificato con MycoPrep BD, quindi centrifugato. Il sedimento è stato utilizzato per la ricerca dei micobatteri tubercolari con metodo RNA ribosomiale Gen Probe e contemporaneamente inoculato nei terreni solidi Lowenstein-Jensen e incubato a 37°C per almeno 8 settimane. L'esame microscopico, anche se di scarsa sensibilità in caso di ridotta carica batterica, è stato sempre eseguito per la immediatezza del risultato che esso può dare. Su 40 pazienti 1 è risultato positivo all'esame microscopico, al test RNA ribosomiale e successivamente all'esame colturale, 2 positivi all'esame batterioscopico e colturale con sviluppo di micobatteri atipici tipizzati come *M. chelonae*. L'indagine sierologica è stata effettuata con metodica ELISA (Omega Diagnostic) che ricerca gli anticorpi IgG e IgA verso l'antigene ricombinante 38 kDa. Su 40 sieri di soggetti con fibrosi cistica 2 presentavano IgG, IgM e IgA ad alto titolo anticorpale, 3 a basso titolo, i rimanenti sono risultati negativi. Si è riscontrata rispondenza tra le indagini sierologiche con presenza di anticorpi ad alto titolo e le indagini colturali. L'aumento delle patologie da micobatteri rende necessario inserire la ricerca dei micobatteri tra gli esami routinari. La ricerca degli anticorpi può indurre ad approfondire le indagini colturali nei pazienti risultati positivi.

RICERCA DI MYCOPLASMA PENETRANS E MYCOPLASMA FERMENTANS IN TESSUTI BIOPTICI PRELEVATI DA PAZIENTI AFFETTI DA SARCOMA DI KAPOSI CLASSICO

^{1, 2}Maria Antonietta Cuccuru, ¹Pier Luigi Fiori, ²Maria Vittoria Masala, ²Francesca Cottoni, ²Decio Cerimele

¹ ⁰Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia Sperimentale e Clinica, Università degli Studi di Sassari.

² Istituto di Dermatologia, Università degli Studi di Sassari.

Il sarcoma di Kaposi (KS) è una neoplasia multifocale d'origine mesenchimale caratterizzata dalla comparsa di lesioni multiple della cute e dei visceri con intensa angiogenesi, infiammazione e proliferazione cellulare. Il KS è stato classificato in quattro forme clinico epidemiologiche: KS classico, KS endemico o Africano, KS iatrogeno, e KS epidemico o associato ad AIDS. L'identificazione di sequenze di DNA di herpes virus 8 nelle cellule tumorali, suggerisce un ruolo primario di questo virus nella patogenesi della neoplasia; si ritiene inoltre che il risultato finale possa essere condizionato da altri fattori e microrganismi. Nel 1989 Lo e coll., presso l'Armed Forces Institute of Pathology e il National Institute of Health, hanno riportato l'isolamento di un batterio simile ai micoplasmi (mycoplasma-like) in pazienti con sarcoma di Kaposi con e senza AIDS. Altri lavori hanno rilevato l'esistenza di una correlazione fra micoplasmi (in particolare *Mycoplasma penetrans* e *M. fermentans*) e sarcoma di Kaposi associato ad AIDS. Il fine di questo lavoro è stato quello di evidenziare la presenza di DNA specifico di *M. penetrans* e di *M. fermentans* in tessuti biotici prelevati da pazienti con sarcoma di Kaposi classico. A tal fine il DNA estratto attraverso trattamento con Fenolo/Cloroformio/Alcool Isoamilico, dalle biopsie ottenute da 29 pazienti con sarcoma di Kaposi classico è stato sottoposto a PCR usando primer specifici per *M. penetrans* e *M. fermentans*. Dal nostro lavoro è risultato che nessuno dei nostri campioni di DNA conteneva sequenze appartenenti alle specie batteriche ricercate. Pertanto si può concludere che nel Sarcoma di Kaposi classico non è rilevante il ruolo dei micoplasmi.

RILEVAMENTO DI IGA SIERICHE ANTI-HSV1 IN CORSO DI IPOACUSIA IMPROVVISA

A. Pellegrino^c, G. Scalia^{a,c}, C.M. Costanzo^a, L. Maiolino^b, D. Luciano^a, R. Melita^a, I. Palermo^c, M. Caruso^a, F. Condorelli^a, A. Serra^b.

^aDipartimento Sc. Microbiol. e Sc. Ginecol.; ^bClinica Otorinolaringoiatrica; ^cLaboratorio Centralizzato, Azienda Policlinico-Università di Catania.

L'ipoacusia improvvisa è una patologia ad etiologia ancora non ben definita. Alcuni autori ipotizzano un'infezione virale alla base di questa patologia con coinvolgimento di diversi virus quali HSV, CMV, morbillo, parvovirus B19, HIV, parotite. I primi tre sono i più frequentemente descritti e molti sono i modelli sperimentali studiati. La difficoltà di definizione è fondamentalmente connessa alla difficoltà di raggiungere in modo poco invasivo il sito di probabile infezione. Il parametro IgA, già precedentemente descritto come significativo per HSV in infezione genitale, ci è sembrato un possibile indice indiretto di riattivazione dell'infezione. Il nostro studio ha compreso 66 sieri ottenuti dai seguenti 55 soggetti: 35 pazienti di otorinolaringoiatria (ORL), di cui 21 affetti da ipoacusia improvvisa mono o bilaterale; 20 soggetti di controllo divisi in due gruppi: alcuni affetti da recidiva herpetica labiale recente ed altri non affetti da HSV né da patologie ORL. Tutti i sieri sono stati saggiati in immunofluorescenza indiretta per la titolazione delle IgA ed in immunoblotting per la valutazione di bande immunoreattive per IgG, IgM ed IgA. I dati ottenuti evidenziano titoli elevati di IgA specifiche in un rilevante numero di soggetti affetti da ipoacusia improvvisa, mono o bilaterale, a fronte di titoli decisamente inferiori nei soggetti di controllo. Inoltre, dati preliminari, indicano una immunoreattività per IgA in immunoblotting verso una proteina ad elevato peso molecolare.

RILEVAMENTO DI RNA DI ENTEROVIRUS IN BAMBINI ALLA DIAGNOSI DI DIABETE MELLITO DI TIPO I

G. Scalia^{a,c}, M. Mancuso^b, C.M. Costanzo^a, G. Milana^a, G. Granata^b, D. Lo Presti^b, C. Ingegnosi^b, I. Palermo^c, M. Caruso-Nicoletti^b.

^a Dipartimento Sc. Microbiol. e Sc. Ginecol.; ^b Dipartimento di Pediatria; ^c Laboratorio Centralizzato, Azienda Policlinico-Università di Catania.

L'infezione da Enterovirus pare giochi un ruolo rilevante nella patogenesi del diabete mellito di tipo I. Si ipotizza che possano agire sia nell'attivazione di processi autoimmuni che nell'accelerazione della distruzione delle betacellule. Mentre nel passato la diagnosi di infezione da Enterovirus era sierologica, più recentemente viene effettuata la ricerca dell'RNA virale nel siero di bambini prediabetici o con recente insorgenza di diabete di tipo I. Abbiamo analizzato i sieri dei bambini ricoverati presso il Dipartimento di Pediatria dell'Azienda Policlinico di Catania tra gennaio e dicembre 2000 per insorgenza di diabete di tipo I. I soggetti studiati erano 23, 13 maschi e 10 femmine, di età compresa tra 4 e 15 anni (media 9,9). I sieri erano ottenuti entro 15 giorni dalla diagnosi in 21 casi ed entro 3 mesi in 2 casi. Come controllo è stato utilizzato un gruppo di 23 bambini non diabetici, comparabili per sesso ed età, seguiti per ritardo di accrescimento. Il materiale impiegato, sia per il prelievo che per la conservazione dei sieri, era "RNAsi free" ed i campioni venivano subito posti a -80°C. L'RNA virale era rilevato mediante una seminested PCR impiegando primers localizzati all'interno di una regione di genoma virale comune ed altamente conservata. Venivano anche determinati ICA, GAD, IAA. L'RNA virale veniva evidenziato in 7/23 (30%) bambini con diagnosi di diabete ed in 0/15 sieri di controllo; gli altri 8 sieri del gruppo di controllo sono in corso di esecuzione. Sei dei 7 campioni positivi per il rilevamento di RNA enterovirale appartenevano a maschi. I soggetti diabetici positivi per RNA enterovirale erano assolutamente comparabili per età ed origine geografica rispetto ai bambini diabetici negativi. La titolazione anticorpale è attualmente in corso di esecuzione. La positività all'RNA enterovirale da noi rilevata nei bambini in prima diagnosi di diabete di tipo I, appare essere significativamente elevata, più di quanto non sia stato attualmente descritto, confermando ulteriormente il ruolo degli Enterovirus nella patogenesi di questo tipo di patologia.

RISPOSTA DIFFERENZIALE DI POPOLAZIONI DI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SOTTOPOSTE AD INDUZIONE DI RESISTENZA AI FLUOROCHINOLONI

S. Puglisi¹, S. Carnazza², R. Musumeci¹, S. Guglielmino², V.M. Nicolosi¹, M. Nicolò², A. Speciale¹

¹ Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche, Sezione di Microbiologia, Università di Catania.

² Dipartimento di Scienze Microbiologiche, Genetiche e Molecolari, Università di Messina.

In questo studio abbiamo selezionato, mediante induzione di tipo "multi-step", mutanti resistenti di tre ceppi di *P. aeruginosa*, due isolati da pazienti affetti da fibrosi cistica e il ceppo standard ATCC 27853, inizialmente sensibili a varie classi di antibiotici; per determinare la selezione nell'ambito dei chemioterapici che risultano tra i più efficaci nei confronti di *P. aeruginosa* abbiamo scelto tre rappresentanti della classe dei fluorochinoloni quali: ciprofloxacina, gatifloxacina e levofloxacina. Dei ceppi di *P. aeruginosa* "wild-type" e dei rispettivi mutanti indotti con i diversi fluorochinoloni sono state valutate le sensibilità a diverse classi di antibiotici, le caratteristiche metaboliche, funzionali e genetiche.

La sensibilità è stata determinata valutando con il metodo della broddiluizione la concentrazione minima inibente (MIC) dei singoli antibiotici usati. Dei ceppi "wild-type" e dei rispettivi mutanti indotti sono state investigate le caratteristiche fisiologico-funzionali determinando le relative curve di crescita tramite il sistema automatizzato Bioscreen C Microbiology Reader-Analyzer (Labsystems). È stata analizzata l'efficienza metabolica in termini di valutazione di biomassa e di sintesi proteica, nonché lo stato energetico mediante tecnica di riduzione di sali di tetrazolio. Una analisi dei "pattern" di restrizione RFLP risolti in PFGE ha permesso di valutare il grado di variazione genomica dei ceppi derivati rispetto al "wild-type".

I risultati ottenuti hanno mostrato che *P. aeruginosa* se sottoposta ad induzione di resistenza ai fluorochinoloni non risponde in modo univoco. I ceppi ATCC 27853, CZ 26 e DG 613 e i loro indotti resistenti alla levofloxacina sono rappresentativi di tre comportamenti limite. I ceppi indotti presentano, infatti, rispetto ai relativi "wild-type", tempi di generazione, punti di saturazione e stabilità delle colture significativamente differenti l'uno dall'altro. L'acquisizione di antibiotico-resistenza, inoltre, non appare legata ad una specifica variazione genetica; infatti, i ceppi indotti possono presentare o meno profili di restrizione variati rispetto ai "wild-type".

RISPOSTA SIEROLOGICA DI CHLAMYDIA PNEUMONIAE IN SOGGETTI CON ATEROSCLEROSI: IgA COME POSSIBILE MARKER SIEROLOGICO NELLA PREVENZIONE

A.Stivala, M.Mirabile, M.Salmeri, A.Garozzo, E.Cammarata, G.Tempera

Dipartimento di Scienze Microbiologiche - Università di Catania;

La Chlamydia pneumoniae, patogeno gram- intracellulare obbligato responsabile generalmente di infezioni del tratto respiratorio, è stato associato, a causa del suo ritrovamento a livello delle placche, nella patogenesi dell'aterosclerosi e di altre malattie croniche a carico del sistema circolatorio. A causa della enorme importanza che rivestono queste patologie nella società moderna, e la notevole circolazione della C.p., circa il 30% della popolazione adulta in Italia presenta anticorpi anti C.p., abbiamo iniziato uno studio per analizzare l'associazione tra sierologia positiva ed eventi acuti del miocardio, e il significato della eventuale presenza di IgA sieriche, che indicano la persistenza del microrganismo nell'ospite, come eventuale parametro routinario di inizio e/o progressione di patologie cardiovascolari.

Sono stati analizzati: 50 sieri di pazienti con AOPD (Chronic Arterial o Peripheral Diseases); 50 con CAD (Carotid Arterial Disease); 34 con AOPD+CAD; 18 con CLI (Critical Limb Ischemia) per un totale di 152 sieri. Inoltre sono stati esaminati 98 sieri con IMA (Infarto Miocardio Acuto) pregresso e/o recente; 26 con Angina ed infine 58 con altre patologie cardiache, per un totale di 182 sieri di soggetti cardiopatici cronici, contro 250 sieri di controllo provenienti da soggetti sani e non affetti da patologie cardiocircolatorie. L'età media dei pazienti era di 53.3 ± 6.7 anni con un range tra 50-61 anni. L'età media del gruppo di controllo era 50.4 ± 4.2 anni range 50-55 anni. La sieropositività nel gruppo degli AOPD era dell'80% per le IgG del 16% per le IgM e il 60% presentava titoli significativi di IgA. Il gruppo CAD presentava l'84% di IgG il 20% di IgM e il 72% di IgA. I 34 soggetti con AOPD+CAD presentavano 82% di IgG, 23% di IgM e 71% di IgA. Infine per il gruppo di CLI abbiamo avuto il 78% di IgG il 22% di IgM e il 78% di IgA. Nel gruppo cardiopatici cronici i soggetti con IMA presentavano il 79.6% di IgG il 18.4% di IgM e il 44.9% di IgA, Mentre nei restanti 58 soggetti con altre patologie si aveva l'84% di IgG il 27.5% di IgM e il 51.7% di IgA. Nei sieri di controllo si aveva solo il 32% delle IgG. In conclusione possiamo dire che si ha una alta prevalenza di anticorpi anti C.p. nei soggetti con patologie a carico del sistema circolatorio sia pregresse che acute, e che la risposta alle IgA, correlata alla cronicità dell'infezione, e valori elevati di IgG possono essere utilizzati nello screening di popolazioni a rischio di evoluzione critica di processi aterosclerotici.

RISULTATI A TRE ANNI DI UNO STUDIO LONGITUDINALE SULLE RELAZIONI TRA APOPTOSI E RISPOSTA ALLA TERAPIA HAART IN PAZIENTI HIV

¹Grelli S., ²d'Ettore G., ³Lauria F., ³Montella F., ¹Di Traglia L., ¹D'Agostini C., ¹Tacconi S., ²Vullo V., ⁴Vella S., ⁵Macchi B., ¹Favalli C., ⁶Mastino A.

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

Allo scopo di indagare sulle relazioni tra la modificazione dei livelli di apoptosi dei linfociti e quelle dei parametri di risposta virologica ed immunologica, è stato condotto uno studio longitudinale aperto in pazienti HIV sottoposti a terapia antiretrovirale ad alta attività (HAART), i cui primi risultati a sei mesi sono stati già resi noti. La coorte dei pazienti è stata esaminata prima dell'ingresso in terapia e dopo 2, 4, 6, 12, 24 e 36 mesi di HAART. Qui riportiamo i risultati di 21 pazienti valutabili, di cui 12 hanno raggiunto i 36 mesi. Dei 21 pazienti, 3 sono andati incontro ad una temporanea interruzione della terapia, caratterizzata da concomitante aumento di viremia ed apoptosi seguito da nuova diminuzione di entrambi i parametri alla ripresa della terapia. Contemporaneamente, il livello di linfociti CD4+ veniva solo lievemente modificato in questi pazienti. Nella maggior parte dei pazienti si è osservato un miglioramento dei parametri virologici ed immunologici, associati a marcata riduzione dell'apoptosi nei primi sei mesi di terapia. I valori di apoptosi si mantenevano fluttuanti per un anno, per poi stabilizzarsi ed essere comparabili a quelli di donatori HIV-negativi, nel successivo periodo di osservazione. Anche la popolazione CD8+ risultava meno suscettibile all'apoptosi spontanea in relazione alla risposta alla terapia. L'espressione di membrana della molecola Fas era significativamente ridotta rispetto ai valori iniziali e quella intracellulare di Bcl-2 subiva solo lievi modifiche di segno positivo. Inoltre, la diminuzione dell'apoptosi era associata con un costante lento aumento nella percentuale della popolazione CD4+/Fas+/CD45RO+ triplo-positiva. Questi ed altri dati suggeriscono che durante la terapia HAART, le variazioni dei livelli di apoptosi spontanea nei linfociti di sangue periferico sono strettamente correlate alla diminuzione della viremia ed alla risposta immunologica, ma giocano un ruolo complesso ed ancora da definire nel meccanismo di immunoricostruzione.

RUOLO DEI RECETTORI TOLL-LIKE NELL'ATTIVAZIONE DI CELLULE DENDRITICHE DA PARTE DI *B.HENSELAE*.

S. Stornello*, D. Ravarino*, P. Cappello[^], H. Heine[§], W. Vermi[#], R. Badolato[”], C. Merlino*, R. Cavallo*, A. Negro Ponzi*, M. Zucca[^], T. Musso*

*Dip. Sanità Pubblica e Microbiologia, Torino, [^]Dip. Scienze Cliniche e Biologiche, Torino, [”]Dip. Pediatria, Brescia, [#] Dip. Patologia, Brescia, [§] Dip. Immunologia e Biologia Cellulare, Borstel (Germania).

I recettori Toll-like (TLRs), sono una famiglia di 10 recettori di superficie che riconoscono complessi molecolari conservati, comuni a gruppi di germi patogeni. TLR4, espresso dai monociti, insieme a molecole accessorie quali CD14 e MD-2 media l'attivazione da LPS di batteri Gram-, mentre TLR2 riconosce il lipoarabinomannano di *M. tuberculosis*, il peptidoglicano dei Gram+ e LPS atipici quali quelli di *Leptospira* o *Porphyromonas*. L'interazione ligando/Toll culmina con la trascrizione di geni di citochine proinfiammatorie, chemochine e molecole costimolatorie. Abbiamo precedentemente dimostrato che *B.henselae*, batterio Gram- responsabile della malattia da graffio di gatto, infetta monociti umani inducendo il rilascio di citochine proinfiammatorie (TNF, IL-6, IL-1), chemochine (IL-8, MCP-1), fattori angiogenetici (VEGF) e ossido nitrico. Poiché la risposta primaria a *B.henselae* dipende da cellule dendritiche presenti nella sede cutanea d'infezione e a livello del granuloma linfonodale, abbiamo analizzato l'attivazione di queste cellule da parte di *B.henselae* ed il coinvolgimento dei relativi recettori TLR. In seguito all'interazione di questo patogeno con cellule dendritiche si osserva secrezione di citochine quali TNF e IL-12. Per identificare i meccanismi di attivazione delle cellule dendritiche abbiamo analizzato il contributo di TLR potenzialmente in grado di riconoscere complessi molecolari appartenenti a *B.henselae*. A questo scopo abbiamo utilizzato la linea cellulare HEK-293 transfettata con cDNA codificante per TLR1, TLR2, TLR4 e TLR6 e/o CD14 e abbiamo valutato il rilascio di IL-8 dopo infezione con *B.henselae*. In queste condizioni, le cellule HEK transfettate con TLR2 vengono attivate a seguito di infezione; inoltre la cotransfezione di TLR6 amplifica la risposta al microorganismo suggerendo che il complesso TLR2/TLR6 riconosca componenti microbici di *B.henselae*. Al contrario, cellule HEK/TLR1 o HEK/TLR4 non vengono attivate dopo interazione con *B.henselae*. Infine, abbiamo dimostrato che le cellule dendritiche mantenute in coltura con o senza aggiunta di *B.henselae* esprimono i recettori TLR2 e TLR4. Pertanto, sulla base dei nostri dati, si può ipotizzare che TLR2 sia potenzialmente coinvolto nella risposta delle cellule dendritiche a *B.henselae*.

RUOLO DEL GENE *CnCDR1* NELLA RESISTENZA DI *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* AL TRATTAMENTO CON FLUCONAZOLO IN UN MODELLO MURINO DI CRIPTOCOCCOSI SISTEMICA

B. Posteraro, M. Sanguinetti, R. Santangelo, M. La Sorda, B. Fiori e G. Fadda

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

Recentemente abbiamo clonato ed identificato il gene *CnCDR1* di *Cryptococcus neoformans* che codifica per una proteina di membrana appartenente alla famiglia degli "ABC transporter", il cui ruolo come determinante di resistenza al fluconazolo è stato poi dimostrato *in vitro* mediante esperimenti di distruzione e ricostituzione genica. Si è voluto quindi investigare il ruolo che *CnCDR1* esplicherebbe nella resistenza *in vivo* di *C. neoformans* al fluconazolo, attraverso un modello animale di criptococcosi sistemica. A tale scopo, uno studio di sopravvivenza animale è stato condotto infettando, mediante iniezione nella vena laterale della coda, 60 topi Balb/C con i seguenti ceppi (20 topi per ogni ceppo): ceppo sensibile al fluconazolo BPY22, ceppo resistente al fluconazolo BPY22.17, ceppo "knock-out" per il gene *CnCDR1* derivato da BPY22.17. Il giorno dopo l'infezione, i topi sono stati randomizzati in 6 gruppi (10 topi per gruppo), 3 dei quali erano iniziati al trattamento con fluconazolo (dose di 10 mg/pro Kg/die), mentre i rimanenti 3 gruppi rimanevano non trattati. La somministrazione del farmaco è stata continuata per 10 giorni consecutivi. Gli animali sono stati ispezionati giornalmente per 40 giorni dall'infezione, durante i quali sono state registrate mortalità e morbilità.

Le curve di sopravvivenza ottenute dimostrano che la mortalità dei topi infettati con il ceppo BPY22.17 è stata del 100% al 19° giorno, mentre quella dei topi infettati con il ceppo BPY22 lo è stata al 24° giorno, così come il 100% di mortalità è stata osservata al 23° giorno per i topi infettati con il ceppo reso "knock-out" per il gene *CnCDR1*. Al 40° giorno dall'infezione, la mortalità dei topi trattati con fluconazolo era del 40% per quelli infettati con il ceppo fluconazolo-sensibile BPY22 e con il ceppo "knock-out", mentre già al 22° giorno era del 100% per quelli infettati con il ceppo BPY22.17. Tali differenze erano statisticamente significative ($P < 0.05$) dimostrando come il gene *CnCDR1* sia effettivamente in grado di influenzare la risposta *in vivo* di *C. neoformans* al trattamento con fluconazolo. Tali dati sono stati confermati da esperimenti di RT-PCR quantitativa che hanno dimostrato che il gene era espresso ad un livello 5 volte superiore nel ceppo fluconazolo-resistente BPY22.17 rispetto a quello sensibile BPY22 quando entrambi i ceppi venivano isolati dal rene e dai polmoni dei topi sottoposti alla terapia con il farmaco antifungino.

RUOLO DELL'INTERLEUCHINA 18 IN UN MODELLO SPERIMENTALE DI ARTRITE SETTICA INDOTTA DA STREPTOCOCCO DI GRUPPO B

Puliti M.¹, von Hunolstein C.², Orefici G.², Bistoni F.¹, Tissi L.¹

¹ *Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università di Perugia,* ² *Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

L'artrite settica è una delle manifestazioni cliniche dell'infezione da streptococco di gruppo B (GBS) nei neonati. Negli adulti l'artrite da GBS è spesso associata all'età e a fattori di rischio (diabete, cancro, cirrosi, malattie cardiovascolari, alcolismo, insufficienza renale cronica, infezioni da HIV). Abbiamo precedentemente dimostrato che l'inoculazione per via endovenosa di GBS sierotipo IV in topi CD1 induceva la comparsa di un'artrite settica multifocale, associata con un'elevata produzione di citochine proinfiammatorie sia a livello sistemico che locale. L'interleuchina 18 (IL-18) è una proteina proinfiammatoria appartenente alla famiglia delle proteine IL-1. Diversi studi hanno dimostrato un suo ruolo nella patogenesi delle lesioni articolari in modelli sperimentali di artrite cronica. Il nostro studio è stato volto a determinare il ruolo dell'IL-18 nell'evoluzione dell'infezione sistemica ed artrite da GBS in topi CD1 infettati con 1×10^7 CFU/topo. Inizialmente sono stati valutati la produzione endogena di IL-18 durante l'infezione e l'effetto della sua neutralizzazione sull'evoluzione dell'infezione. In seguito, i topi sono stati trattati con diverse dosi di IL-18 (da 0,01 a 0,5 µg/topo) per quattro giorni, ad iniziare da 1 ora prima dell'infezione con una dose subartritogena di GBS. Sono state quindi valutate: mortalità, evoluzione dell'artrite, crescita batterica negli organi, produzione locale e sistemica di citochine. Un graduale aumento della concentrazione di IL-18 era evidente durante l'infezione sia a livello articolare che sistemico. Le concentrazioni più elevate erano raggiunte 7 giorni dopo l'infezione. La neutralizzazione della IL-18 endogena risultava in una diminuzione significativa dell'incidenza e della severità dell'artrite. Al miglioramento delle lesioni articolari corrispondeva una diminuzione della produzione locale di IL-6. La somministrazione esogena di IL-18 in topi infettati con una dose subartritogena di GBS portava ad un peggioramento delle lesioni articolari, con un effetto dose-dipendente. In conclusione, questi risultati indicano che IL-18 contribuisce alla patogenesi dell'artrite indotta da GBS. Una terapia con anticorpi anti-IL-18 potrebbe essere presa in considerazione nel trattamento di questa patologia.

RUOLO DELL'INTERLEUCHINA 18 NELLE INFEZIONI DA STREPTOCOCCO DI GRUPPO B

V. Cusumano, R. Galbo, A. Bruzzese, G. Mancuso, A. Midiri, G. Teti

Dipartimento di Patologia e Microbiologia sperimentale dell'Università di Messina

Lo streptococco di gruppo B (SGB) è un'importante causa di sepsi sia in neonati che in adulti con patologia predisponenti, quali diabete, cirrosi e tumori solidi. Queste infezioni sono spesso rapidamente mortali nonostante la terapia antibiotica. E', pertanto, utile la messa a punto di strategie alternative.

Nello studio presente sono stati indagati il ruolo dell'interleuchina-18 (IL-18) endogena in queste infezioni e gli effetti della somministrazione di IL-18 ricombinante in un modello di sepsi neonatale da SGB nel topo. Nel corso dell'infezione sperimentale si sono osservati incrementi significativi di IL-18 nel sangue e nella milza, che sono stati determinati mediante test ELISA. Il blocco dell'attività biologica dell'IL-18 mediante anticorpi neutralizzanti di coniglio ha provocato un incremento della mortalità e del numero di unità formanti colonie (CFU) nei reni, nel fegato e nel polmone. La somministrazione di IL-18 ricombinante ha incrementato la sopravvivenza ed ha determinato una riduzione delle CFU nei reni.

I risultati indicano che la IL-18 viene prodotta in risposta all'infezione con SGB e che svolge un ruolo importante nelle difese del neonato nei confronti di tali batteri. La somministrazione terapeutica di IL-18 potrebbe essere utile nelle infezioni neonatali da SGB.

SELEZIONE DI UNA VARIANTE SARDA DEL RETROVIRUS ASSOCIATO ALLA SCLEROSI MULTIPLA (MSRV) E SUA MODULAZIONE E RILASCIO IN VITRO DA PBMC DI SOGGETTI VIRUS POSITIVI.

Mameli G*, Arru G*, Rodriguez M*, Sotgiu S#, Dolei A*, Serra C*

* *Sez. di Microbiologia Sperimentale e Clinica, Dip. di Scienze Biomediche e #Clinica Neurologica, Università di Sassari.*

La patogenesi della sclerosi multipla (MS) si ritiene sia dovuta all'interazione tra fattori genetici e ambientali, che determinano l'insorgere di una complessa risposta (auto)immunitaria che porta alla demielinizzazione. Secondo l'ipotesi ambientale, la causa del processo infiammatorio immuno-mediato potrebbe essere un virus. Pertanto ci siamo occupati dello studio bio-molecolare del MSRV, un membro esogeno della famiglia di retrovirus endogeni umani HERV-W, associato alla sclerosi multipla, 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*.

Gli amplificati di campioni scelti a caso in soggetti di accertata origine sarda sono stati analizzati tramite dideossi-sequenziamento di un amplificato lungo 300 nucleotidi del gene *pol* di MSRV. Le sequenze sono state confrontate con sequenze già note presenti in banca dati. L'allineamento delle sequenze indica una elevata identità tra le sequenze sarde (97.5%, estremi: 94.3-99.7%), indipendentemente dallo stato clinico dei soggetti donatori. Tali sequenze evidenziano la presenza di una variante sarda molto simile geneticamente nel gene *pol* a quella "consensus" di MSRV (AF 009668), con una identità del 93.3% (estremi: 91.5-94.2%). Arrivando al 95.0% (estremi: 94.0-96.0) di omologia, escluse due delezioni, rispetto alla sequenza di HERV-W derivata da particelle rilasciate da colture di sinoviociti prelevati da un paziente con artrite reumatoide (RA) (AF 072494). Da questi dati si deduce che la variante sarda nel gene *pol* è filogeneticamente intermedia tra le sequenze RA e "consensus" di MSRV. In seguito abbiamo verificato *in vitro* che i 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 dose dipendente della resa di MRSV, come si verifica per altri retrovirus. Un dato interessante è costituito dal fatto che in cellule trattate con IFN α 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 in accordo con i dati clinici.

SENSIBILITÀ DI PATOGENI RESPIRATORI ED URINARI A CEFTIBUTEN IN PARAGONE AD ALTRI ANTIBIOTICI ORALI

L. Lombardo, G. Blandino F.Caccamo, I. Milazzo, A. Boccazzi*, G. Nicoletti

Dipartimento di Scienze Microbiologiche – Università di Catania

*Clinica Pediatrica - Università di Milano

Per permettere una corretta terapia empirica ragionata è importante disporre di dati di attività antibatterica recenti ed aggiornati. Scopo dello studio è stato quello di saggiare l'attività di ceftibuten nei confronti di patogeni isolati nel 2001 da infezioni respiratorie ed urinarie acquisite in comunità in paragone ad altre β -lattamine, a macrolidi e a chinoloni.

Le MIC₉₀ di ceftibuten erano:

S.pyogenes (100): 2 mg/l; streptococchi orali (50): 8 mg/l; *S. pneumoniae* Pen S (45): 0,5 mg/l; *S.pneumoniae* Pen I (15): 4 mg/l; *S.pneumoniae* Pen R (10): > 32 mg/l; *H.influenzae* (100): 0,12 mg/l; *H. parainfluenzae* (50): 0,12 mg/l; *M.catarrhalis* (50): 2 mg/l; *E.coli* (100): 0,5 mg/l; *K.pneumoniae* (30): \leq 0,5 mg/l; *P.mirabilis* (30): 1 mg/l; *P.vulgaris* (30): 2 mg/l.

Nei confronti dei batteri Gram positivi ceftibuten ha un'attività sovrapponibile alle altre cefalosporine orali saggiate (cefaclor, cefprozil, cefixime); è invece, più attivo dei macrolidi (claritromicina ed azitromicina) e dei fluorochinoloni (ciprofloxacina e levofloxacina). Nei confronti di *Haemophilus spp.* e *M.catarrhalis*, ceftibuten è più attivo di cefaclor e cefprozil e dei macrolidi saggiati. Nei confronti di Enterobacteriaceae, ceftibuten mostra un'attività uguale a quella di cefixime e leggermente superiore ad amoxicillina/acido clavulanico.

SENSIBILITÀ *IN VITRO* DI *ASPERGILLUS FUMIGATUS* NEI CONFRONTI DI VORICONAZOLO, AMFOTERICINA B E ITRACONAZOLO: COMPARAZIONE CON DUE DIVERSE MODALITÀ D'INOCULO

Drago M., Scaltrito M.M., Bonomi C., Sisto F., Morace G.
Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Milano

L'attività *in vitro* di voriconazolo, amfotericina B e itraconazolo è stata saggiata nei confronti di 18 ceppi di *Aspergillus fumigatus* isolati da pazienti con fibrosi cistica (Dr. Lisa Cariani, Istituti Clinici di Perfezionamento, Milano).

Il saggio è stato effettuato secondo la metodologia raccomandata dal National Committee for Clinical Laboratory Standards (micrometodo di diluizione in brodo Document NCCLS M38-P) e comparata ad un sistema analogo sperimentale (Sensititre), con due diverse modalità d'inoculo. Gli inoculi erano costituiti da una sospensione conidiale contenente approssimativamente da $0,4$ a 5×10^4 CFU/ml, preparati da colture di 2 e 7 giorni in agar patata a 37°C . I risultati venivano letti visivamente dopo 48 ore di incubazione e le minime concentrazioni inibenti erano riportate come CMI_0 (completa inibizione della crescita) e CMI_2 (riduzione della crescita del 50% rispetto al controllo).

I risultati ottenuti con i due sistemi sono sovrapponibili con uno scarto massimo di una concentrazione. Le modalità d'inoculo non sembrano influenzare l'attività *in vitro* delle sostanze. I dati confermano l'ottima attività delle sostanze in esame e dimostrano che il voriconazolo può essere considerato una valida alternativa all'amfotericina B e all'itraconazolo.

Inoltre risulta evidente che almeno per *Aspergillus fumigatus* i dati di sensibilità *in vitro* possono essere ottenuti anche con inoculi preparati da colture di 2 giorni. Tale possibilità offre un indiscutibile vantaggio nel diminuire i tempi di refertazione e per iniziare una terapia mirata.

SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI DEGLI STREPTOCOCCI ORALI E CAPACITÀ DI TRASFERIRE ERITROMICINO RESISTENZA

Dolcino M., L. Arboit, A. Zoratti, E.A. Debbia, A. Marchese
Sezione di Microbiologia C. A. Romanzi, Università degli Studi di Genova

Lo sviluppo della resistenza agli agenti antimicrobici costituisce oggi un serio problema anche per il trattamento delle infezioni a carico del parodonto. Gli Streptococchi viridanti, considerati in passato quasi uniformemente sensibili a β -lattamici, aminoglicosidi, tetracicline e macrolidi, non sono oggi immuni dall'emergente fenomeno dello sviluppo della resistenza nei confronti di molti antibiotici.

In questo studio sono stati analizzati 400 Streptococchi viridanti (200 ceppi eritromicino-resistenti e 200 ceppi penicillino-resistenti) isolati dalla cavità orale, determinandone la sensibilità nei confronti di 14 antibiotici selezionati.

E' stata inoltre valutata la capacità da parte di questi microorganismi di trasferire i determinanti dell'eritromicino resistenza.

Tra i 200 Streptococchi eritromicino-resistenti studiati l'8% presentava un intermedio livello di resistenza all'eritromicina ($\text{MIC} = 0.5 \text{ mg/ml}$) mentre il 92% risultava ad elevato livello ($\text{MIC} \geq 1 \text{ mg/ml}$) di resistenza.

I beta-lattamici maggiormente attivi si rivelavano cefotaxime e cefuroxime (94% e 87% di ceppi sensibili rispettivamente), seguiti da amoxicillina (80% di ceppi sensibili) e penicillina (69% di ceppi sensibili). Solo il 3% dei ceppi esprimeva un alto livello di resistenza a cefotaxime mentre per cefuroxime tale percentuale rimaneva limitata al 5%. Per penicillina tuttavia la percentuale di ceppi ad elevato livello di resistenza ($\text{MIC} \geq 4 \text{ mg/ml}$) saliva al 10%, mentre il 21% dei ceppi esprimeva un intermedio livello di resistenza ($0.25 \leq \text{MIC} \leq 2 \text{ mg/ml}$).

Un discreto numero di ceppi (52%) risultava inoltre resistente alla tetraciclina.

Nell'ambito degli Streptococchi penicillino-resistenti le percentuali osservate di ceppi esprimono un elevato livello di resistenza nei confronti dei penicillina ed amoxicillina si attestavano al 39% e 12% rispettivamente. Per cefotaxime invece si registrava un 8% di ceppi ad elevato livello di resistenza, mentre cefuroxime riconfermava il valore (5%) già riscontrato per i ceppi eritromicino-resistenti. Il 39% dei ceppi è inoltre risultato resistente alla tetraciclina.

Sempre per quanto concerne i ceppi penicillino-resistenti, piuttosto alte erano le percentuali di ceppi risultati altamente resistenti ad eritromicina (63%) e clindamicina (32%).

Tutti gli Streptococchi studiati sono risultati uniformemente sensibili alla vancomicina ($\text{MIC} \leq 1 \text{ mg/ml}$). Per tutti i microrganismi saggiati inoltre altamente efficaci si dimostravano i chinoloni, il cloramfenicolo e la rifampicina.

La frequenza di ricombinanti ottenuti a seguito di esperimenti di coniugazione era compresa tra 6×10^{-7} e 1.3×10^{-6} , mentre risultava compresa tra 7.2×10^{-6} e 3.4×10^{-5} quella ottenuta mediante trasformazione.

SEQUENZIAMENTO DEL GENE PER LA 23 S RIBOSOMIALE DI *MYCOPLASMA FERMENTANS* GROUP ED IDENTIFICAZIONE DI DOMINI CORRELATI CON L'ANTIBIOTICO RESISTENZA

L. S. Catania¹, F. Maugeri¹, P. Di Pietro¹, G. Rappazzo², M. P. Musumarra¹, L.S. Roccasalva, G. Tempera¹, P. M. Furneri¹
¹Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche e ²Dipartimento di Biologia Animale, Università di Catania

M. fermentans è stato isolato per la prima volta nel 1953 dal tratto urogenitale di pazienti con balaniti e vulvovaginiti. E' in grado di fermentare glucosio, maltosio, fruttosio, destrina, amido e glicogeno ma non mannosio, saccarosio e lattosio. Inoltre è capace di utilizzare l'arginina come ulteriore sorgente di energia. E' omofermentativo, infatti, circa 80% del glucosio addizionato al terreno di coltura è convertito in acido lattico. Il suo genoma pesa 4,8 X10⁸ Da. Negli anni '70 *M. fermentans* è stato isolato dal midollo osseo di pazienti leucemici e non leucemici e si è appurato che induce reazioni leucemoidi e linfadenopatie in animali da esperimento. *M. fermentans* ha attività mitogenica sui linfociti umani B e T. Molto importante dal punto di vista epidemiologico è l'alta frequenza di infezioni da *M. fermentans* in pazienti con AIDS o infettati con HIV-1 rispetto ai sani usati come controllo. L'interazione di *M. fermentans* con i linfociti è alla base del processo patogenetico. Infatti, l'inserimento dei componenti della membrana micoplasmica nelle membrane dei linfociti può influenzare il legame, l'integrazione, e/o l'inserimento o l'espressione di HIV riducendo la resistenza dell'ospite all'infezione. La chemiosensibilità di *M. fermentans* è stata quanto mai dibattuta e tutt'oggi sono aperte molte controversie. Lo scopo del nostro lavoro è il sequenziamento del gene 23S rRNA di *Mycoplasma fermentans* group (K7, PG18, *incognitus*). L'ottenimento di tale sequenza rappresenta il punto di partenza per eventuali studi sulle divergenze presenti che possono correlare a resistenza verso antibiotici conosciuti. L'analisi delle sequenze ci ha permesso di ipotizzare che il meccanismo di resistenza all'eritromicina nei ceppi K7 e PG18 è probabilmente dovuto allo stato di omozigosi di una transizione G2057A che, come già dimostrato in *M. hominis* ed in altri batteri è responsabile di tale resistenza. Al contrario nei ceppi sub specie *incognitus* i due operoni della 23S si mostrano eterozigoti, e solo uno dei due mostra la transizione G2057A. Non sono stati riscontrate altre mutazioni correlabili ad altri fenotipi di resistenza.

SEQUENZIAMENTO DEL GENE PER LA 23 S RIBOSOMIALE DI *MYCOPLASMA HOMINIS* ED IDENTIFICAZIONE DI DOMINI CORRELATI CON L'ANTIBIOTICO RESISTENZA

F. Maugeri¹, P. Di Pietro¹, G. Rappazzo², M. P. Musumarra¹, L. S. Roccasalva¹, G. Tempera¹, P.M.Furneri¹

¹Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche e ²Dipartimento di Biologia Animale, Università di Catania

Il lavoro si propone di sequenziare il gene della 23S rRNA in *Mycoplasma hominis* ceppo PG 21. L'analisi di tale sequenza e alla base di eventuali studi sui meccanismi di resistenza nei confronti di alcune classi di antibiotici che agiscono sulla subunità 50S, causandone delle mutazioni puntiformi.

Attraverso lo studio della mappa genomica di *Mycoplasma hominis* ceppo PG21 si è potuto osservare che il *M. hominis*, così come altri *Mollicutes*, possiede solo due operoni per gli rRNA (rrnA ed rrnB) molto distanti tra loro (200 kb), a differenza degli altri procarioti che ne posseggono da 5 a 10 copie. Le subunità ribosomiali sono invece posizionate nel cromosoma nella classica maniera procariotica, nell'ordine 5'-16S-23S-5S -3' intervallate da sequenze spaziatrici (spacer). Eseguendo una ricerca sulla Genbank delle sequenze note delle varie subunità ribosomiali di specie di *Mycoplasma* filogeneticamente vicine al *M. hominis* (*M. flocculare*, *M. pneumoniae*, *M. hyopneumoniae*, ecc..) è stato possibile effettuare uno studio di allineamento, allo scopo di individuare le zone a più alto grado di omologia. Queste zone altamente conservate sono state scelte per la progettazione di oligonucleotidi che sono stati utilizzati come primers nelle reazioni di PCR necessarie per ottenere i vari frammenti di DNA che sono stati clonati in ceppi di *Escherichia coli* resi competenti. I vari frammenti ottenuti, sia i cloni sia i prodotti di PCR, sono stati sequenziali ed il gene è stato interamente ricostruito. Sono state riscontrate notevoli divergenze di basi, spesso correlabili alla resistenza verso l'eritromicina ed il cloramfenicolo: G1120A; G1239A; C1243T; G2057A.

SEQUENZIAMENTO DEL GENOMA DI *MYCOPLASMA HOMINIS*: II. STRATEGIE PER L'IDENTIFICAZIONE E IL CLONAGGIO DEI GENI PER LE PROTEINE RIBOSOMIALI.

M.P. Musumarra¹, M.R. Milioti¹, C. Catra¹, F. Butera¹, P. Di Pietro¹, F. Maugeri¹, M. G. Crispino¹, G. Rappazzo², P.M. Furneri¹

¹Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche e ²Dipartimento di Biologia Animale, Università di Catania

I micoplasmi sono classificati in un gruppo tassonomico (classe dei *Mollicutes*) distinto dai batteri con parete; comunemente essi, però, sono chiamati micoplasmi sia appartengano al genere *Mycoplasma*, sia facciano parte di un altro genere. La filogenesi dei micoplasmi è stata chiarita mediante l'analisi delle subunità ribosomiali 16S e 5S e delle sequenze dei tRNA: da questo studio si è dedotto che i micoplasmi hanno avuto origine dai batteri gram-positivi, con DNA a basso contenuto di G+C. Gli esperimenti sono stati condotti sul ceppo PG 21 di *M. hominis*. *M. hominis* è stato fatto crescere in terreno liquido SP4 arricchito con arginina e glucosio. Per identificare e clonare i geni delle proteine ribosomiali sono state adottate due strategie: a) Progettazione di primer per PCR per individuare ed amplificare le sequenze geniche delle proteine; b) realizzazione di uno studio pilota con banca plasmidica in pUC19 nella quale clonare i geni delle proteine ribosomiali. Nella procedura A sono state realizzati 36 primer sulla base di studi filogenetici condotti sui clusters delle proteine ribosomiali di microrganismi filogeneticamente e non filogeneticamente correlati. Nella procedura B si è proceduto alla ligazione del vettore pUC19 con il DNA di *Mycoplasma hominis* digerito con Sau 3AI, quindi alla trasformazione delle cellule XL1 blue MRF⁺, ed infine allo screening delle colonie per individuare le cellule che avevano acquisito l'inserito.

Attualmente sono state identificate e sequenziate 3 proteine ribosomiali: L2, S12 ed S7. Fra le tre proteine isolate di particolare importanza è la proteina S7 che è localizzata nella testa della 30S ed è coinvolta nell'assemblaggio della testa al corpo della subunità minore. In particolare la S7, che si trova vicino al sito di interazione mRNA-tRNA, è probabilmente coinvolta nella decodificazione dell'informazione trasportata dall'mRNA.

SIGNIFICATIVO INCREMENTO DI INDAGINI PARASSITOLOGICHE. IL PERCHE' DELL'AUMENTATO INTERESSE DEI CLINICI: IL RILANCIO DI UN SETTORE

Plaisant P., Massucci L., Nacci A., Fadda G.

Istituto di Microbiologia Università Cattolica del Sacro Cuore Largo Vito 1, 00168 Roma

Il consuntivo dell'anno 2001 del Laboratorio di Microbiologia del Policlinico Universitario A.Gemelli di Roma ha dimostrato un incremento delle richieste di esami parassitologici provenienti dai reparti di Medicina Interna, di Chirurgia e di Pediatria del 38.5% rispetto all'anno precedente. Nei primi otto mesi del 2002 tale numero è ulteriormente aumentato di circa il 5%. Tale risultato è da imputare alla decisione presa nell'autunno del 2000 di dare impulso al settore rendendolo più moderno e dinamico anche con l'introduzione di nuove metodiche di biologia molecolare alcune delle quali sono già di routine e altre in fase sperimentale.

La percentuale di rilevamento e identificazione dei vari parassiti e le principali metodiche impiegate vengono sinteticamente illustrate. Vengono altresì illustrati i motivi che, a nostro avviso, hanno portato a tali risultati. Tra questi i principali sono: a) L'apertura di una linea diretta con il clinico spesso coinvolto personalmente sia in fase anamnestica che diagnostica; b) L'ottenimento di campioni raccolti e trasportati in modo ottimale; c) La tempestività della risposta.

SINERGIA DELLE INDAGINI BIOMOLECOLARI E SIEROLOGICHE VERSO VIRUS COXSACKIE B NELLA PRECISAZIONE DIAGNOSTICA DELLE MIOPERICARDITI

E. Musumeci^a, I. Monte^b, G. Scalia^{a,c}, C.M. Costanzo^a, G. Milana^a, G. Di Silvestro^b, I. Palermo^c, D. Giannazzo^b, F. Condorelli^a, L. Alario^a, A. Pellegrino^c, G. Modica^b.

^aDipartimento Sc. Microbiol. e Sc. Ginecol.; ^bU.O. Cardiologia e ^cLaboratorio Centralizzato, Azienda Policlinico-Università di Catania.

La definizione etiologica delle miopericarditi si è di norma basata su indagini sierologiche mediante fissazione del complemento o altre metodiche che permettono il rilievo di IgG ed IgM. Non sempre i dati sierologici così ottenuti sono dirimenti sia per l'assenza delle IgM che per valori di IgG o movimenti di titolo anticorpale non significativi. L'isolamento del virus in adeguati campioni patologici appare poco praticabile per l'invasività dei metodi di acquisizione del campione stesso; d'altro canto il reperimento del virus in campioni fecali non sempre è significativo a causa dell'elevata circolazione degli enterovirus in particolari zone geografiche. Abbiamo analizzato 18 prelievi di siero provenienti da 12 pazienti affetti da pericardite ed 8 sieri prelevati da 5 pazienti affetti da miopericardite. Come gruppo di controllo sono stati analizzati 15 sieri provenienti da soggetti sani comparabili, per sesso, età e provenienza geografica, ai soggetti affetti da patologia cardiaca. I sieri venivano raccolti impiegando materiale a perdere "RNAsi free" e venivano aliquotati per l'esecuzione della ricerca di RNA enterovirale e per la titolazione delle IgG, IgM ed IgA anti-Coxsackie B. I risultati ottenuti sui campioni provenienti dai soggetti affetti da patologie cardiache indicano una buona correlazione tra i dati di ricerca dell'RNA enterovirale e l'andamento anticorpale con speciale riguardo alle IgA; dall'interpolazione dei dati, ottenuti in doppio cieco, sembra di notevole rilievo diagnostico l'impiego in sinergia dei dati relativi alla biologia molecolare ed alla titolazione degli anticorpi specifici.

SINERGIA TRA GLICOPEPTIDI E β -LATTAMICI NEI CONFRONTI DI CEPPI DI *STAPHYLOCOCCUS HAEMOLYTICUS* SENSIBILI E RESISTENTI ALLA TEICOPLANINA

Carla Vignaroli, Michela Catena, Pietro E. Varaldo, Francesca Biavasco
Istituto di Microbiologia e Scienze Biomediche dell'Università di Ancona

La sinergia fra glicopeptidi e β -lattamici nei confronti degli stafilococchi, in particolare di ceppi glicopeptido-resistenti, è stata dimostrata *in vitro* in diversi studi, anche se i dati riportati sono talora contrastanti. L'effettiva efficacia di tale associazione risulta particolarmente importante dopo la recentissima comparsa di ceppi di stafilococco altamente resistenti ai glicopeptidi e contenenti i ben noti determinati genetici degli enterococchi. In questo studio è stata valutata l'efficacia dell'associazione fra glicopeptidi e β -lattamici nei confronti di coppie isogeniche sensibile/resistente alla teicoplanina di *Staphylococcus haemolyticus*, due (1S-1R e 2S-2R) *mecA*-negative e due (3S-3R and 4S-4R) *mecA*-positive. Tutti i derivati resistenti mostravano un aumento di 8-16 volte della MIC della teicoplanina, ma nessuna variazione delle MIC di vancomicina e oxacillina. Rispetto al ceppo parentale teicoplanino-sensibile, le MIC della penicillina dei due derivati resistenti *mecA*-negativi diminuivano rispettivamente di >64 e 8 volte, mentre quelle dei due derivati *mecA*-positivi rimanevano invariate, così come le MIC dell'ampicillina (ad eccezione del derivato 1R che mostrava una diminuzione della MIC di ampicillina di 32 volte). Le associazioni di teicoplanina o vancomicina con oxacillina, penicillina o ampicillina sono risultate sinergiche nei confronti di tutti i ceppi saggiati, sia sensibili che resistenti alla teicoplanina; per alcune concentrazioni di β -lattamico è stato però osservato un effetto paradossale, associato ad una ridotta autolisi. La sinergia è risultata particolarmente evidente nei confronti dei derivati resistenti *mecA*-positivi, per i quali, in piastre addizionate di teicoplanina, è stato osservato anche il fenomeno del doppio alone intorno ai dischetti di penicillina e di ampicillina ed un alone di inibizione incompleta intorno al dischetto di oxacillina. In base ai risultati ottenuti, il fenomeno del doppio alone sembra da mettere in rapporto con la presenza di *mecA*. L'analisi di popolazione ha evidenziato inoltre una correlazione tra il fenomeno del doppio alone e il livello e il tipo (etero o omo) di resistenza ai glicopeptidi. La presenza di un doppio alone intorno ai dischetti di penicillina e ampicillina potrebbe anche dipendere dalla ridotta attività autolitica evidenziata in presenza di particolari concentrazioni di questi antibiotici, che potrebbe anche essere responsabile dell'effetto paradossale osservato.

SORVEGLIANZA MICROBIOLOGICA OSPEDALIERA: CONTRIBUTO D'ESPERIENZE

Condorelli Mario, Romeo Maria Antonietta, Pantò Giuseppe

tel. 095 7264234, fax 095 7264232 presso A. O. Cannizzaro Catania email: lab.cannizzaro@tin.it

comunicazione orale dr. Condorelli, iscritto al Congresso

La sorveglianza microbiologica in ambito ospedaliero è di fondamentale importanza non soltanto per le considerazioni epidemiologiche, dato il continuo divenire della flora batterica e dell'ambiente, ma anche per il risvolto derivante dallo studio in terapia, prognosi e profilassi. L'apporto delle singole esperienze sommandosi arricchisce un patrimonio, contribuendo alla mappatura epidemiologica ed al conseguente razionale utilizzo dei presidi terapeutici e profilattici.

Si presenta la prevalenza di microrganismi isolati nel Laboratorio di Microbiologia dell'A. O. Cannizzaro di Catania, e la statistica di sensibilità ad antibiotici per l'anno compreso dal 1 settembre 2000 e il 31 agosto 2001, utilizzando piastre Biomèrieux, ed eseguendo identificazione ed antibiogramma su sceptor e phoenix Becton Dickinson, oltre a metodiche manuali secondo Kirby Bauer.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS, PROTEINA A ED ACIDO LIPOTEICOICO MODULANO IN TEMPI DIVERSI IL PROCESSO INFIAMMATORIO E LA RISPOSTA IMMUNE IN CHERATINOCITI UMANI: RUOLO DI HSP ED INOS NELLA STABILIZZAZIONE CITOPLASMATICA DI IKB E NELLA PROTEZIONE.

G. Donnarumma, D. Criscuolo, I. Paoletti, M. D'Acerno, M.A. Tufano.

DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE, SEZIONE DI MICROBIOLOGIA E MICROBIOLOGIA CLINICA
-SECONDA UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

I cheratinociti, cellule epiteliali epidermiche, sono coinvolti nelle funzioni immunologiche ed infiammatorie della cute, attraverso la regolazione della produzione di citochine come TNF- α , IL-10 e IL-8. Inoltre i cheratinociti intervengono nel riparo del danno tessutale e fungono da target immunologico grazie alla presenza, sulla loro superficie, di molecole di adesione. *Staphylococcus aureus*, importante patogeno a livello cutaneo, invade il tessuto legandosi, mediante le proteine che legano la fibronectina (FnBP), alle integrine del cheratinocita. Nell'adesione ed internalizzazione dello *S. aureus* sono coinvolte anche le proteine da shock termico (HSP), le quali sembrano svolgere le loro funzioni mediante modulazione dell'enzima ossido nitrico sintasi (i-NOS). Scopo di questo lavoro è valutare la regolazione della produzione di HSP, i-NOS, ICAM-1 ed integrine in cheratinociti in seguito all'internalizzazione di *S. aureus*, nonché la modulazione dell'espressione di citochine quali TNF- α , IL-10 e IL-8, sia in presenza di *S. aureus* internalizzato che dei suoi componenti strutturali di superficie, quali PA e LTA. Inoltre è stata analizzata, anche, la sintesi del complesso proteico citoplasmatico I κ B, inibitore del fattore trascrizionale nucleare NF κ B. I risultati di questo studio sperimentale avvalorano fortemente l'ipotesi che la risposta immunitaria dei cheratinociti, osservata in seguito all'infezione da *S. aureus*, dipende essenzialmente dall'internalizzazione del batterio. *S. aureus* internalizzato attiva precocemente la risposta della fase acuta con over espressione di citochine e molecole di adesione nonché attivazione di HSP e modulazione dell'enzima i-NOS che, per i suoi effetti battericidi ed antiapoptotici, limita l'invasione e la disseminazione batterica. Di contro nelle fasi più avanzate dell'infezione sono i costituenti batterici a sostenere, continuare ed aumentare sia la fase acuta che il binding dei linfociti ai cheratinociti. Nella fase precoce dell'infezione si osserva stabilizzazione di I κ B con conseguente riduzione del processo infiammatorio. Tali effetti sono sostenuti nel tempo da componenti di superficie batterica come PA ed LTA. In conclusione i nostri risultati suggeriscono un importante ruolo del cheratinocita *in vivo* nel sostenere attivamente i meccanismi di difesa immunitaria della cute nei confronti di agenti infettivi.

STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA: TIPIZZAZIONE DI CEPPI DI RECENTE ISOLAMENTO CLINICO CON SISTEMI BIOCHIMICI E MOLECOLARI.

Giordano A., Magni A., Trancassini M., Varesi P., Mancini C.

Dipartimento di Scienze e Sanità Pubblica Sezione di Microbiologia Università degli Studi di Roma "La Sapienza".

In tempi relativamente recenti vi è stato un aumento di isolamento di *Stenotrophomonas maltophilia* come causa di infezioni nosocomiali e colonizzazioni del tratto respiratorio nel paziente affetto da Fibrosi Cistica (FC). Con l'incremento dell'incidenza di tale specie l'accuratezza dell'identificazione assume maggiore importanza e diversi sono i metodi di tipizzazione descritti negli studi epidemiologici.

Sono stati studiati 66 ceppi di *S.maltophilia* isolati, presso il Servizio Speciale Analisi Microbiologiche I Azienda Policlinico Umberto I di Roma, sia da campioni di pazienti ricoverati presso vari reparti (43.9%) che da campioni di pazienti affetti da FC (56.1%). Sono stati inseriti nello studio, come controlli, *S.maltophilia* ATCC 13637, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *Brevundimonas vesicularis* e *Flavobacterium (Chryseobacterium) meningosepticum* ATCC 13253. I ceppi sono stati tipizzati biochimicamente sia con le gallerie API 20NE (bioMérieux Mercy-l'Etoile, France) che con le card ID-GNB del sistema automatico Vitek2 (bioMérieux Mercy-l'Etoile, France). Per superare i problemi associati con l'identificazione definitiva abbiamo eseguito una PCR specie-specifica (SS-PCR) utilizzando due primer, SM1 e SM4, parte specifica del gene 23S rRNA.

Entrambi i metodi biochimici hanno tipizzato 49 ceppi (74.24%) con la dizione di "eccellente identificazione"; tuttavia il sistema Api 20NE presenta una percentuale superiore di tipizzazione eccellente (92.42%). I due sistemi non hanno comunque evidenziato errori, ma solo variazioni nel T index. La SS-PCR eseguita con la coppia di primer SM1-SM4, usando come template il DNA genomico, ha evidenziato una banda di circa 531 bp nei 66 ceppi di *S.maltophilia* e in *S.maltophilia* ATCC 13637, mentre sui ceppi di *P.aeruginosa* ATCC 27853, *Brevundimonas vesicularis* e *Flavobacterium (Chryseobacterium) meningosepticum* ATCC 13253 non si sono evidenziate bande, mostrando pertanto una specificità e una sensibilità del 100%.

Pur evidenziando i due sistemi biochimici una buona affidabilità e uso nella routine di laboratorio, nello studio dei pazienti affetti da FC, sarebbe opportuno a scopi epidemiologici utilizzare le tecniche di biologia molecolare per valutare le variabilità genomiche nell'ambito clinico.

STREPTOCOCCUS PYOGENES: IDENTIFICAZIONE DI CARATTERI FENOTIPICI E GENOTIPICI

S.Bianco, E.Burdino, T.Alice e D.Savoia.

Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Università di Torino.

La virulenza di *Streptococcus pyogenes* è legata alla produzione di esotossine che svolgono un'azione importante nella patogenesi invasiva.

Al fine di caratterizzare gli Streptococchi di gruppo A circolanti nel nostro distretto sono stati esaminati 142 ceppi, di cui 5 provenienti da patologie invasive (batteriemie, polmonite, fascite), ed i restanti isolati da tamponi faringotonsillari effettuati in bambini con forme faringee o con scarlattina. In tali microorganismi sono stati ricercati, mediante PCR, i geni per la produzione di particolari proteine: *speA* (esotossina pirogena), *speF* (fattore mitogeno) e *prtF₁* (proteina F₁). E' stata inoltre presa in esame la resistenza batterica ai macrolidi. In tutti i ceppi analizzati è stata dimostrata la presenza di *speF*, mentre *speA* è risultato presente nel 24% degli isolati da faringotonsilliti, nel 61% dei campioni provenienti da casi di scarlattina e nel 100% dei ceppi responsabili di patologie invasive. In questi ultimi il gene *prtF₁* non è stato riscontrato, mentre è risultato presente nel 37% degli isolati faringotonsillari. Per la maggior parte (72%) i ceppi con fenotipo di resistenza M sono risultati negativi per tale gene. Il gene *prtF₁* è stato caratterizzato utilizzando primers complementari ad una regione genomica di 111 paia di basi (RD2) ripetuta in modo variabile. Soltanto in un ceppo dotato di resistenza inducibile è stato dimostrato un amplicone caratterizzato da 3 ripetizioni RD2 (banda di 330 paia di basi), in tutti gli altri il prodotto della PCR presentava 4 ripetizioni RD2.

La presenza nei batteri del fattore di opacità (OF), carattere che risulta assente nella maggior parte dei ceppi di *S. pyogenes* appartenenti ai sierotipi più virulenti, è stata valutata in relazione alla presenza dei geni *speA* e *prtF₁*. L'80% dei ceppi responsabili di patologie invasive risulta OF-, *speA*+ e *prtF₁*-, mentre la maggior parte dei ceppi faringotonsillari risulta OF+, *speA*- e *prtF₁*+.

Questi risultati confermano il ruolo della proteina prodotta dal gene *prtF₁* nel processo di attacco dei microorganismi alle cellule epiteliali, prima tappa per una successiva internalizzazione. La presenza di tale carattere nei batteri riveste quindi un ruolo importante nella patogenesi faringotonsillare predisponendo ad un'eventuale cronicizzazione dell'infezione.

STUDIO DELLA TRASMISSIBILITÀ FAMILIARE DI BATTERI ANAEROBI IMPLICATI NELLE PARODONTOPATIE

Favaro M¹., Fontana C^{1,2}., Minelli S¹., Cicchetti O¹., Daddona G³., Gioia L³., Favalli C^{1,2}.

1 Laboratori di Microbiologia Clinica Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico Tor Vergata viale Oxford 81 – Roma

2 Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche Università degli Studi di Roma Tor Vergata Via Montpellier 1 Roma

3 Dipartimento di Odontoiatria Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico Tor Vergata Viale Oxford 81 – Roma.

E' ormai dato acquisito il ruolo eziologico di batteri anaerobi, capnofili o microaerofili nelle parodontopatie. Il danno al tessuto di sostegno del dente, con perdita del legamento parodontale e riassorbimento dell'osso alveolare, è causato oltre che per i meccanismi diretti svolti dagli stessi batteri anche per le conseguenze della reazione immunitaria dell'ospite. Il microbiota orale è estremamente complesso e questo rende difficile ricondurre ad uno o pochi patogeni l'eziologia parodontale. Tuttavia sembra accertato il ruolo svolto dall'*A.actinomycetemcomitans* o di alcune bacteroidaceae tra cui il *P.gingivalis* (tipico nell'adulto), la *P.intermedia* o il *B.forsythus*. Altre specie batteriche come il *T.denticola*, il *C.rectus*, la *Capnocytophaga* spp., pur essendo isolate con minore frequenza, sono anch'esse correlate con le parodontiti. Nello sviluppo della malattia sono evocati aspetti di familiarità e di ereditarietà. Di recente è stata suggerita una possibile relazione fra i possibili polimorfismi di un cluster di geni di IL-1 polimorfismo (nella posizione 899 del gene IL-1A ed un secondo in posizione 3953 del gene IL-1B) e la malattia parodontale. L'IL-1 sembra innescare nella parodontopatia vari meccanismi distruttivi compresa l'attivazione del riassorbimento osseo. Ai fini diagnostici tale ricerca non sembra avere un ruolo univoco dato che il polimorfismo del locus dell'IL-1 è evocato anche in altre patologie, tra cui quelle sostenute da *H.pylori*. Dal momento che i meccanismi di ereditarietà sembrano ancora oggetto di controverse discussioni, il nostro lavoro si è concentrato sullo studio della familiarità di tale patologie partendo dal presupposto che la convivenza potesse di per se stessa rappresentare un fattore predisponente. La trasmissibilità di questi patogeni nell'ambito familiare è stata valutata con un'analisi degli esiti degli esami colturali nei vari componenti della stessa famiglia ed attraverso uno studio genetico degli isolati ed è stato altresì stabilito il rapporto di percentuale relativa dei patogeni presenti. I dati preliminari su 64 pazienti, tra cui 7 diversi nuclei familiari, mostrano una frequenza di isolamento di *P.gingivalis* pari al 50%, di *B.forsythus* pari al 29% e di *P.intermedia* del 14%. Con frequenze d'isolamento <10% seguono *C.rectus*, *Capnocytophaga* ed *A.actinomycetemcomitans*. Interessanti sono anche i dati inerenti l'antibiotico resistenza che mostra per tutti una resistenza al metronidazolo particolarmente elevata (compresa fra il 33-100% degli isolati, con percentuali più elevate per *P.gingivalis*). La comparazione dei dati forniti dal metodo colturale tradizionale con quello molecolare, ci ha permesso di evidenziare insolite associazioni tra germi nelle forme più aggressive di parodontopatia, come il trinomio: *B.forsythus*, *T.denticola*, *P.gingivalis* (29-32% dei casi). Interessanti sono i dati di casi di trasmissibilità nell'ambito familiare, tutti riconducibili ad un unico patogeno: *P.gingivalis*.

STUDIO EPIDEMIOLOGICO SULLE INFEZIONI COMUNITARIE DELLE BASSE VIE RESPIRATORIE E SULLE RESISTENZE AGLI ANTIBIOTICI DEI PATOGENI BATTERICI IN CAUSA: RISULTATI DEL PROGETTO EOLO (2001)

S. Mannelli¹, G. Corrao², F. De Benedetto³, C.F. Donner⁴, M. Ochan⁵, G. Nicoletti⁶, C. M. Sanguinetti⁷, M. Scatigna⁵, G. Sevieri⁸, G.C. Schito¹ per il Progetto EOLO

1. Sezione di Microbiologia C.A. Romanzi, Università di Genova; 2. Dipartimento di Statistica, Università di Milano; 3. Unità

Operativa Complessa di Pneumologia, Ospedale San Camillo De Lellis, Asl di Chieti; 4. Dipartimento di Pneumologia, Fondazione Salvatore Maugeri, Centro Medico di Veruno (NO); 5. Medical Department, Bayer (MI); 6. Dipartimento di Scienze microbiologiche e Scienze ginecologiche, Università di Catania; 7. Unità Operativa Complessa di Pneumologia, A.C.O. San Filippo Neri (Roma); 8. Viareggio, (Lucca)

Obiettivi: sono state studiate l'epidemiologia dei batteri patogeni responsabili delle infezioni delle basse vie respiratorie acquisite in ambito comunitario e le corrispondenti resistenze ai farmaci antimicrobici più comunemente impiegati in terapia.

Metodi: la copertura del territorio nazionale è stata assicurata da 360 Medici di Medicina Generale, suddivisi in gruppi di 12, ognuno dei quali ha fatto riferimento ad uno pneumologo coordinatore e ad un centro microbiologico di riferimento.

Risultati: sono stati arruolati 860 pazienti, di cui 727 (88.0%) hanno fornito espettorato. Di tali campioni, 515 (70.8%) si sono dimostrati validi secondo il criterio di Bartlett e sono stati quindi coltivati. Dei 515 soggetti considerati significativi per l'analisi microbiologica, i maschi hanno rappresentato il 67.4% e le femmine il 32.6%. L'età media era di 69.1 anni per i maschi e di 65.6 per le femmine. La diagnosi clinica ricevuta è stata: 92.0% (449) riacutizzazioni di bronchite cronica (AECB) e 8.0% (39) polmoniti comunitarie (CAP).

L'eziologia delle AECB è risultata variabile in funzione dei centri. Il 6.5% circa dei casi era sostenuto da più microrganismi. I patogeni più incidenti sono stati: *S. pneumoniae* (12.9%), *H. influenzae* (19.5%), *H. parainfluenzae* (17.9%), *M. catarrhalis* (9.6%), *S. aureus* (15.2%) seguiti da Enterobatteri e Gram-negativi non fermentanti. La resistenza di *S. pneumoniae* nei confronti di penicillina era del 13% (6.5% alto livello, 6.5% basso livello) mentre quella ai macrolidi era del 35.7%. Un solo ceppo di pneumococco è stato segnalato come resistente a moxifloxacin. La produzione di β -lattamasi in *H. influenzae* raggiungeva il 33%. Più elevata è stata quella espressa da *H. parainfluenzae* e *M. catarrhalis*. Nelle CAP, *S. pneumoniae* ha rappresentato il 14.8% dei germi isolati, *H. influenzae* il 22.2%, *H. parainfluenzae* il 18.5% e *S. aureus* il 29.6%.

Conclusioni: questa sorveglianza epidemiologica conferma, a livello italiano, il ruolo dei principali patogeni respiratori nell'eziologia di AECB e CAP. L'incidenza di resistenze riscontrata rispecchia i dati della Letteratura nostrana. Tra i farmaci più attivi deve essere segnalata moxifloxacin che ha dimostrato in questo studio un'attività superiore a quella dei β -lattamici e dei macrolidi saggiati.

STUDIO SULL'EFFICACIA DI CLOREXIDINA E IODIO- POVIDONE PER LA DISINFEZIONE PRE-CHIRURGICA DELLE MANI

Leone F., Mazzella P., Morandotti G.A., Ranno S., Fadda G

Istituto di Microbiologia Università Cattolica del Sacro Cuore Largo Vito1, 00168 Roma

Obiettivo. La disinfezione pre-chirurgica delle mani, mediante spazzolini o spugnette impregnate con antisettici, rimane un'importante pratica chirurgica ospedaliera per prevenire infezioni nosocomiali. Abbiamo ritenuto di notevole interesse valutare l'attività battericida di due prodotti quali clorexidina al 4% e iodio-povidone al 7.5% nei confronti di isopropanolo al 60%, disinfettante a base alcolica.

Metodologia. Sono stati sottoposti a saggio un gruppo di venti volontari. L'abbattimento della carica microbica espressa in UFC/ml relativa alle mani (destra e sinistra) di ciascun soggetto dopo tre minuti di contatto con i prodotti in esame è stata valutata secondo la procedura EN12791/1997 che considera parametri essenziali: un pre-valore immediato e sostenuto, un post-valore immediato (dopo disinfezione) e un post-valore sostenuto dopo tre ore dalla disinfezione.

Risultati. I valori numerici relativi alla carica microbica dei parametri essenziali sono stati trasformati in log decimale e, per ciascun soggetto, è stato calcolato il log RF (fattore di riduzione) immediato e sostenuto; inoltre è stata fatta una elaborazione statistica di tali risultati (secondo il metodo di Wilcoxon).

Conclusioni. L'uso di spazzolini chirurgici con clorexidina e/o iodio-povidone per la disinfezione delle mani, ha dimostrato avere un risultato superiore o uguale rispetto al disinfettante a base alcolica (isopropanolo). Infatti la carica microbica calcolata in UFC/ml relativa alle mani di ciascun soggetto esaminato risulta, nella maggior parte dei casi, con un fattore di riduzione (RF) non dissimile di quello di riferimento. Tale risultato è un requisito essenziale per definire l'efficacia di un disinfettante in accordo con quanto specificato dalla procedura EN 12791/1997.

TIPIZZAZIONE BATTERICA MEDIANTE ELETTROFORESI IN CAMPO PULSATO: LE ESIGENZE DI UNA INTERA POPOLAZIONE NON CORRISPONDONO A QUELLE DEL SINGOLO INDIVIDUO.

Giovanni M. Giammanco

Dipartimento di Igiene e Microbiologia "G. D'Alessandro", Università degli Studi di Palermo.

La *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) è una tecnica di tipizzazione batterica di grande interesse perché combina un elevatissimo potere di risoluzione con una ottima riproducibilità e standardizzazione. Tuttavia, essa può avere efficacia diversa in rapporto all'origine ed alle caratteristiche epidemiologiche dei ceppi in esame.

Nella nostra esperienza, la PFGE è stata perfettamente in grado di mostrare la comune origine di ceppi strettamente correlati dal punto di vista epidemiologico, come abbiamo potuto osservare con l'esame di numerosi ceppi isolati in occasione di un episodio epidemico di tossinfezione alimentare da *Salmonella* Enteritidis e di ceppi di *Agrobacterium tumefaciens* isolati da due casi di infezioni nosocomiali. L'utilizzo di più enzimi di restrizione e l'applicazione dei parametri standardizzati da F.C. Tenover per l'interpretazione dei risultati hanno permesso di determinare precisamente l'identità genetica dei singoli ceppi.

Affiancando alla PFGE la digitalizzazione dei profili di restrizione e l'utilizzo di algoritmi per il calcolo del loro coefficiente di similitudine è stato possibile dimostrare la correlazione genetica di ceppi del raro serovar 48:z35:- di *Salmonella bongori* isolati in Sicilia ed in Calabria nell'arco di 20 anni. Casi sporadici e piccole epidemie di enterite in bambini di età <3 anni ed in soggetti immunocompromessi, erano l'espressione dell'endemica persistenza della progenie di un unico clone ancestrale mantenutosi nel tempo senza notevoli modificazioni nell'Italia meridionale.

Al contrario, l'applicazione della PFGE a studi epidemiologici su larga scala è risultato deludente. La caratterizzazione di ceppi di *Escherichia coli* O157:H7 isolati da casi umani di sindrome emolitica uremica (SEU) in Italia settentrionale e di diarrea in Francia, da bovini di allevamenti francesi e dell'Italia settentrionale e da animali appena importati in Sicilia dalla Francia e dalla Spagna non ha permesso di apprezzare nessun carattere peculiare nei loro profili di restrizione in grado di correlarli con la loro origine geografica o con le loro caratteristiche di virulenza.

In conclusione, la PFGE si conferma essere un metodo di tipizzazione perfettamente adatto alle esigenze di tracciabilità di un singolo clone epidemico o di ceppi endemici strettamente correlati geneticamente, ma non sembra idonea alla caratterizzazione epidemiologica di ceppi circolanti su larga scala geografica.

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* MEDIANTE RAPD

Ingianni A.[°], Quartuccio M.^{**}, Faccinelli B.^{*}, Madeddu M.A.[°] e Pompei R.[°]

[°]Sez. Microbiologia Applicata – Università di Cagliari e ^{*}Istituto di Microbiologia, Università di Ancona, ^{**}Biotechne (Cagliari)

La *Listeria monocytogenes*, è un microrganismo ubiquitario in natura ed è spesso presente come contaminante negli alimenti. Il consumo di alimenti contaminati può provocare gravi infezioni in persone sensibili e debilitate.

In questo lavoro è stato effettuato uno studio epidemiologico di ceppi di *L.monocytogenes* isolati da campioni di alimenti, provenienti da diverse industrie nella provincia di Cagliari. Sono stati analizzati 157 campioni di diversa origine alimentare (vegetali, carni, latte e suoi derivati) e sono stati isolati ed identificati 30 (19.1%) ceppi di *L.monocytogenes*, mediante i tradizionali test biochimici e PCR. E' stata quindi eseguita su questi ceppi un'analisi epidemiologica mediante l'amplificazione randomizzata del DNA polimorfico (RAPD). La RAPD è stata eseguita anche su alcuni ceppi di collezione di origine alimentare e clinica, per fare un confronto fra i genotipi ottenuti.

METODI: Sono stati utilizzati quattro oligonucleotidi da 10 basi ciascuno, A1 (5'-AACGCGCAAC-3'), A2 (5'-CCGCAGCAA-3'), A3 (5'-CCGAAGCTGC-3'), A4 (5'-AGGGAACGAG-3'). Gli oligonucleotidi A1, A2, A3 e A4 hanno evidenziato rispettivamente 24, 13, 13 e 16 genotipi differenti. I genotipi osservati nei ceppi isolati nei laboratori in provincia di Cagliari e Oristano non erano quasi mai rappresentati nei ceppi di collezione e in quelli provenienti da laboratori universitari o ospedalieri della penisola.

Il primer A1 ha mostrato una capacità discriminatoria molto più elevata rispetto agli altri oligonucleotidi utilizzati, in quanto ha messo in evidenza 24 differenti patterns costituiti da 2, fino a 18 bande diverse. Mediante la RAPD è stato possibile verificare la simultanea contaminazione di 2 campioni alimentari (6.6%) da parte di due diversi ceppi di *L.monocytogenes*. Genotipi identici sono stati osservati in listerie isolate da campioni provenienti dalla stessa industria in tempi diversi, fatto che suggerisce la persistenza di uno stesso clone di *L.monocytogenes* negli impianti di lavorazione.

CONCLUSIONI: La RAPD è da considerare un valido strumento per eseguire studi epidemiologici di *L.monocytogenes* isolate nei campioni provenienti da industrie alimentari e per valutare un'eventuale contaminazione del campione da parte di ceppi di *L.monocytogenes* appartenenti a genotipi differenti.

Ricerca finanziata dalla **Fondazione Banco di Sardegna**.

UN MUTANTE PspC⁻ DI *Streptococcus pneumoniae* MOSTRA AUMENTATA SUSCETTIBILITA' AGLI IMMUNOEFFETTORI CEREBRALI.

Blasi¹ E., Colombari¹ B., Chiavolini² D., Neglia¹ R., Mucci¹ A., Iannelli² F., Pozzi² G.

¹Dip. Sc. Igienistiche, Microbiologiche e Biostatistiche, Univ. Modena-Reggio Emilia

²LAMMB, Dip. Biologia Molecolare, Univ. Siena

BASE: *Streptococcus pneumoniae* è un patogeno che comunemente colonizza le prime vie respiratorie, ma in presenza di cause predisponenti, può diffondere ai polmoni o ad altri distretti incluso quello cerebrale. Le ragioni per cui alcuni ceppi di *S. pneumoniae* sono più virulenti di altri sono ancora oggetto di studi. Tra i fattori di virulenza di *S. pneumoniae* sono ben conosciuti la capsula polisaccaridica e la pneumolisina, mentre per altri fattori, come la proteina pneumococcica di superficie C (PspC), il meccanismo di azione non è ancora ben definito.

SCOPO: è stato valutato il ruolo di PspC nella suscettibilità del patogeno a cellule immunocompetenti del distretto cerebrale quali la microglia.

METODI: sono stati utilizzati il ceppo selvaggio HB565 (un derivato streptomina resistente del ceppo classico di tipo 3, A66) e il mutante FP20, nel quale il gene PspC è stato deletato. Tali ceppi sono stati impiegati in modelli di infezione in vitro verso cellule di microglia murina (linea BV2); cellule BV2 infettate con i 2 ceppi sono state valutate per alterazioni morfologiche, attività di killing e produzione di citochine.

RISULTATI: il ceppo mutante FP20 è risultato più suscettibile del ceppo selvaggio ai sistemi di killing della microglia, indipendentemente dai tempi impiegati e dallo stato di attivazione dell'immunoefettore. Inoltre, il ceppo mutante FP20 è in grado di evocare nella microglia, una risposta secretoria maggiore rispetto al ceppo selvaggio da cui è stato originato.

CONCLUSIONI: la proteina PspC condiziona la resistenza/suscettibilità di *S. pneumoniae* alle cellule di microglia, implicando che possa essere direttamente coinvolta nel processo di invasione/colonizzazione del distretto cerebrale eludendo i sistemi di difesa mediati dagli immunoeffettori residenti.

UN NUOVO SISTEMA DI EFFLUSSO IN CEPPI DI *STREPTOCOCCUS PYOGENES* CON RESISTENZA INDUCIBILE ALL'ERITROMICINA

Eleonora Giovanetti, Andrea Brenciani, Roberto Burioni, Maria P. Montanari, Pietro E. Varaldo
Istituto di Microbiologia e Scienze Biomediche, Università di Ancona

I ceppi di *Streptococcus pyogenes* con resistenza inducibile a macrolidi, lincosamidi e streptogramina B (antibiotici MLS) possono essere suddivisi in tre fenotipi: iMLS-A, iMLS-B e iMLS-C. Questo studio si è focalizzato sui ceppi di *S. pyogenes* inducibilmente resistenti all'eritromicina dei fenotipi iMLS-B e iMLS-C, i quali sono molto simili e praticamente indistinguibili riguardo a numerose caratteristiche fenotipiche e genotipiche, ma differiscono chiaramente nel loro grado di resistenza agli antibiotici MLS (alto nei ceppi iMLS-B e basso nei ceppi iMLS-C). Come atteso in base ai nostri studi precedenti, i ceppi iMLS-B e iMLS-C saggiati avevano il gene di metilasi *erm*(TR); i ceppi iMLS-A e quelli costitutivamente resistenti (cMLS) avevano il gene di metilasi *erm*(AM); e un ceppo M di controllo aveva il gene di efflusso *mef*(A). Altri geni d'efflusso di macrolidi descritti in cocchi gram-positivi, come *mre*(A) and *msr*(A/B), non sono stati riscontrati in alcun ceppo. Con una tecnica basata sull'impiego di eritromicina marcata per determinare l'accumulo intracellulare del farmaco in assenza e in presenza di un inibitore delle pompe d'efflusso, un efflusso attivo di eritromicina è stato osservato nei ceppi iMLS-B così come nel ceppo M, ma non nei ceppi iMLS-C. Col metodo del triplo dischetto (eritromicina più clindamicina e josamicina), eseguito sia in terreno normale sia nello stesso terreno con l'aggiunta dell'inibitore delle pompe d'efflusso, in questa seconda condizione i ceppi iMLS-B e iMLS-C non erano più distinguibili, in quanto tutti mostravano un fenotipo iMLS-C. In esperimenti di coniugazione in cui è stato utilizzato come donatore un ceppo iMLS-B e come ricevente un derivato Rif^R Fus^R di un ceppo iMLS-C, sono stati ottenuti transconiuganti tutti di fenotipo iMLS-B come il donatore, cui assomigliavano anche sotto ogni altro aspetto, compresa la presenza di una pompa di efflusso. Questi risultati indicano l'esistenza di un nuovo sistema d'efflusso peculiare dei ceppi iMLS-B: un sistema trasferibile, non associato a *mef*(A) né ad altri geni di efflusso dei macrolidi già noti. Mentre la resistenza a basso livello dei ceppi iMLS-C agli antibiotici MLS appare dovuta alla metilasi codificata dal gene *erm*(TR), la resistenza ad alto livello dei ceppi iMLS-B appare dovuta alla stessa metilasi più il nuovo sistema di efflusso.

UTILIZZO DELLA PCR PER LA CONFERMA DI TOXOPLASMOSE CEREBRALE IN UN PAZIENTE TRAPIANTATO

Calderaro A., Dettori G., Piccolo G., Bommezzadri S., Galati L., Ragni P., Guégan R., Zuelli C., Arcangeletti M.C., Medici M.C., Tedeschi F¹., Chezzi C.

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio-Sezione di Microbiologia ¹Sezione di Anatomia Patologica, Università degli studi di Parma.

Una lesione cerebrale nodulare-neoplastiforme a livello frontale parasagittale destro è stata osservata mediante TAC in un paziente trapiantato renale immunodepresso. L'esame istopatologico effettuato su biopsie stereotassiche della lesione e di zone perilesionali ha escluso una neoplasia, ha invece evidenziato reperti di encefalite con necrosi miliari-focali e non ha evidenziato lesioni compatibili con infezione da Citomegalovirus (CMV) ed Herpes Simplex Virus tipo 1 e 2 (HSV 1-2); tale reperto era orientativo per encefalite da toxoplasma. Biopsia cerebrale e liquor sono stati utilizzati per la ricerca di un frammento del gene B1 di *T. gondii* mediante saggio nested-PCR "Toxoplasma gondii gene B1" (Amplimedical). Sono stati pure ricercati Enterovirus, Virus JC, Parvovirus B19, HSV 1-2, Epstein-Barr-virus (EBV) e CMV sia mediante esame colturale convenzionale, sia mediante saggi molecolari. Anticorpi anti-*T. gondii* e virus-specifici sono stati inoltre ricercati in campioni di siero. Un campione di liquor prelevato un mese dopo l'inizio della terapia anti-*T. gondii* è stato nuovamente sottoposto alla ricerca del DNA del parassita e dei virus sopraelencati.

L'esame istopatologico della biopsia del corpo calloso ha rivelato una lesione attribuibile a *T. gondii*: il DNA di *T. gondii* è stato ritrovato nella stessa biopsia e nel liquor. Nel siero è stata dimostrata la presenza di IgG anti-*T. gondii* (1806 UI/ml) e assenza di IgM. Campioni di liquor e biopsia cerebrale sono risultati positivi anche per la presenza del DNA di CMV ed EBV e negativi per gli altri virus. Nel siero sono state ritrovate IgG e IgM anti-CMV e IgG anti-EBV. Le indagini colturali convenzionali per la ricerca dei virus hanno dato esito negativo. DNA di *T. gondii* e di EBV è stato ritrovato anche nel campione di liquor prelevato un mese dopo l'inizio della terapia antiparassitaria.

I risultati di questo studio rivelano la grande utilità del saggio molecolare "Toxoplasma gondii gene B1" quale ausilio alla diagnosi di laboratorio di toxoplasmosi. E' difficile attribuire un ruolo primario all'uno o all'altro degli agenti infettivi osservati: CMV, EBV e *T. gondii*. Resta il fatto che la lesione non aveva aspetto istopatologico tipico di meningo-encefalite da CMV o EBV e la sua dimensione radiologica risultava ridotta dopo terapia antiparassitaria.

VACCINAZIONE ANTIIDIOTIPICA NEI CONFRONTI DI INFEZIONI SPERIMENTALI DA *NEISSERIA MENINGITIDIS* DI GRUPPO B CON ANTICORPI RICOMBINANTI IMMAGINI INTERNE DEL POLISACCARIDE CAPSULARE

W. Magliani¹, S. Conti¹, S. Arseni¹, G. Mancuso², C. Beninati², A. Midiri², G. Teti², L. Polonelli¹

Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Università degli Studi, Parma (1); Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Patologia e Medicina Sperimentale, Università degli Studi, Messina (2)

La capsula di *Neisseria meningitidis* di Gruppo B (MenB) rappresenta un importante fattore di virulenza per il batterio ed anticorpi diretti nei confronti del polisaccaride capsulare (PC) sono altamente protettivi nei confronti dell'infezione. Le somiglianze antigeniche tra l'acido sialico di PC con glicoproteine polisialilate espresse su cellule di tessuti umani inficiano l'uso di PC quale vaccino, per la possibilità di produzione di autoanticorpi.

Un anticorpo monoclonale (mAb Seam 3) diretto nei confronti di PC, dimostratosi battericida *in vitro* in presenza di complemento e privo di reazioni crociate nei confronti di cellule umane, è stato utilizzato quale immunogeno per immunizzare topi dai cui splenociti è stato purificato l'mRNA, utilizzato per la costruzione di una libreria anticorpale fagemidica.

Da tale libreria e da una libreria anticorpale sintetica umana già disponibile sono stati selezionati anticorpi antiidiotipici ricombinanti a singolo filamento (scFv), specificamente reattivi in un sistema immunoenzimatico nei confronti di mAb Seam 3. Due scFv (B2, murino, e ETH1, umano) sono stati selezionati per la loro capacità di competere *in vitro* con MenB PC per il legame sia con mAb Seam3 sia con anticorpi specifici di coniglio. Quando utilizzati quali immunogeni, tali scFv erano in grado di stimolare, in topi e conigli, la produzione di anticorpi specifici reattivi con MenB PC, ma non con cellule umane esprimenti acido polisialico. Tale risposta anticorpale poteva essere richiamata significativamente inoculando cellule di MenB uccise, dimostrando la sua specificità e l'instaurarsi di una memoria immunologica, ed era, inoltre, di tipo Th1, come attestato dalla predominanza dell'isotipo IgG2a. Il siero degli animali così immunizzati, trasferito passivamente, era in grado di proteggere significativamente topolini neonati da infezioni sperimentali sistemiche sostenute da MenB.

Anticorpi antiidiotipici ricombinanti immagini proteiche interne di MenB PC si propongono quali possibili candidati per la vaccinazione nei confronti delle infezioni sostenute da MenB.

VAGINOSI BATTERICA IN GRAVIDANZA: STUDIO CLINICO/MICROBIOLOGICO SULL'EFFICACIA DEL TRATTAMENTO ANTIBIOTICO NELLA PREVENZIONE DEL PARTO PRETERMINE.

M.Torre, E. Cammarata, M. Caccamo, V. Catalano, S.Carnevale, *S.Corsello

Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze ginecologiche - Università di Catania;

* Unità di Ost/Ginecol. Presidio Ospedaliero Paternò

Con il termine "vaginosi batterica" si intendono quelle sindromi cliniche ad eziologia polimicrobica batterica, caratterizzate da alterazione dell'ecosistema vaginale con sostituzione della normale flora lattobacillare da parte di microrganismi potenzialmente patogeni. L'insorgenza di una V.B. in gravidanza rappresenta un importante fattore di rischio di sviluppo di corioamnionite, endometrite post-partum, rottura prematura delle membrane e parto pretermine (queste ultime direttamente collegate alla nascita di neonati a rischio); è quindi ampiamente giustificato un trattamento antibiotico mirato.

Per quanto riguarda la scelta terapeutica, in assenza di una indicazione comunemente accettata, come linea guida italiana, ci si può riferire a quella del CDC di Atlanta che considera prioritario lo screening ed il trattamento con Metronidazolo o con Clindamicina all'inizio del secondo trimestre di gestazione.

Nell'intento di ricercare sempre nuove terapie che possano coniugare un'efficacia clinica ad un'ottima compliance, abbiamo voluto verificare l'efficacia clinica/microbiologica di una nuova formulazione recentemente disponibile anche in Italia) di clindamicina - ovuli vaginali da 100mg, in cui la percentuale di assorbimento del prodotto attivo risulta aumentata del 5% rispetto alla formulazione crema. Grazie a queste caratteristiche, studi pilota, hanno infatti dimostrato la possibilità di ottenere lo stesso risultato terapeutico con una terapia di soli tre giorni.

I nostri risultati dimostrano che in 160 donne in gravidanza (di cui il 62.5% riportavano in anamnesi fattori di rischio per PPT), lo screening per vaginosi batterica effettuato all'inizio del secondo trimestre di gravidanza (dalla 17^a alla 32^a settimana di gestazione) ed il trattamento con Clindamicina ovuli vaginali in monosomministrazione per 3gg. ha drasticamente ridotto il rischio di parto pretermine (98.8% di parti in epoca > 37^a settimana) anche se dal punto di vista squisitamente microbiologico non si è notato lo stesso grado di ripristino dell'omeostasi vaginale (98% di ricolonizzazione lattobacillare, con persistenza di clue-cells nel 22% dei casi). In nessun caso inoltre sono state evidenziate complicanze neonatali. Questa discrepanza tra il dato clinico e quello microbiologico necessita sicuramente di ulteriori approfondimenti, anche se potrebbe essere spiegato con la constatazione che il trattamento antibiotico nei soggetti in cui non si notava eradicazione dei patogeni, ha comunque ridotto la concentrazione di microrganismi al di sotto di quella soglia di rischio per induzione di parto pretermine.

VALUTAZIONE "IN VITRO" DELL'INTERAZIONE TRA FARMACI ANTIFUNGINI E ANTIVIRALI IN CEPPI DI *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*.

C.Casolari*, T.Rossi^, C.Farina°, A.Ruberto, ^G.Baggio^, A.Zanca^, M.Castelli^.

*Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Università di Modena e Reggio.

^Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Modena e Reggio.

°Unità Operativa di Microbiologia e Virologia, Ospedali Riuniti di Bergamo.

L'insorgenza di criptococcosi in corso di sindrome da immunodeficienza acquisita impone il trattamento di due diverse patologie (quella opportunistica oltre a quella di base) e pertanto l'impiego contemporaneo sia di farmaci antivirali che antifungini (per lo più anfotericina B eventualmente associata a flucitosina o talora fluconazolo). Scopo della nostra ricerca è stato quello di verificare "in vitro" quale tipo di interazione possa indurre l'associazione di tali farmaci su *C.neoformans*, considerando che su *Candida spp.* è stata dimostrata una attività inibente da parte di antiproteasici impiegati in terapia antivirale (1,2,3). Sono stati pertanto testati 25 ceppi di *C.neoformans* di isolamento clinico da pazienti con AIDS nei riguardi di 5-fluorcitosina, anfotericina B, miconazolo, fluconazolo in associazione con due diversi antivirali: un antiproteasico (saquinavir) e un inibitore della transcriptasi inversa (azidotimidina). I risultati ottenuti indicano l'assenza di antagonismo in tutti i ceppi testati con tutte le diverse associazioni di antifungini e antivirali dimostrando invece un sinergismo con potenziamento esclusivamente nelle associazioni con saquinavir nei riguardi di tutti i ceppi sensibili agli antimicotici. In particolare l'antimicotico più efficace in associazione è risultato essere il fluconazolo con un potenziamento verificato nel 61%. Nei ceppi fluconazolo resistenti (CMI 70µ/ml) l'effetto sinergico è venuto a mancare ed è stato sostituito da indifferenza. Lo stesso tipo di interazione indifferente e l'assenza di potenziamento è stato riscontrato nelle associazioni con azidotimidina, verosimilmente in rapporto al diverso meccanismo d'azione. I nostri risultati pertanto, oltre a dimostrare un'ottima interazione tra saquinavir e antimicotici, fanno supporre che gli antiproteasici possano avere una azione inibitoria oltre che su *Candida spp.* anche su *C.neoformans*.

1) Cassone A. et al. In vitro and in vivo anticandidal activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors. *J.Infect.Dis.* 1999;180:448-453.

2) Monod M. et al. The inhibition of *Candida albicans* secreted aspartic protease by three different HIV protease inhibitors. *Dermatology* 1999;198:412-414.

3) Mata-Essayag S. et al. In vitro antifungal activity of protease inhibitors. *Mycopathologia* 2000;152:135-142.

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL PLATINO SULLA SUSCETTIBILITÀ CELLULARE ALL'INFEZIONE DA VIRUS INFLUENZALE

A.Iuvara, (1), L.Nencioni, (1), L.Hernandez, (1), A. T.Palamara, (2), E.Garaci, (1).

(1) *Dip. Med. Spe., Univ. "Tor Vergata" Roma.* (2) *Ist. Microbiol., Univ. "La Sapienza" Roma.*

L'utilizzo di metalli pesanti, come il platino, nelle marmite catalitiche favorisce una forte ecodispersione degli stessi, costituendo un importante fattore di rischio esteso a larghe fasce della popolazione. Tra gli effetti tossici attribuiti al platino, dati in letteratura hanno messo in evidenza alterazioni dello stato ossido-riduttivo (redox) in vari distretti corporei di soggetti o animali particolarmente esposti. Nostri precedenti studi hanno dimostrato che lo stato redox intracellulare riveste un ruolo chiave nel controllo della replicazione di diversi virus. In particolare, è stato evidenziato che uno stato intracellulare pro-ossidante costituisce un fattore favorente per lo svolgimento del ciclo vitale del virus.

L'obiettivo del presente studio è stato quello di valutare la possibilità che il trattamento con cis-platinum diamminclorato (CDDP) possa incrementare la replicazione del virus influenzale attraverso l'induzione nelle cellule di stress ossidativo. È stata altresì valutata l'efficacia di glutatione e N-Acetilcisteina, sostanze antiossidanti, nel correggere l'eventuale alterata suscettibilità all'infezione indotta dal metallo. A tal fine, sono state utilizzate come modello sperimentale cellule di rene di cane MDCK, trattate o meno con il metallo ed infettate con virus influenzale A/PR8/34 (H1N1). Lo stato redox intracellulare è stato valutato in termini di equilibrio tra glutatione ridotto ed ossidato (GSH/GSSG).

Il CDDP causava fenomeni di citotossicità, se aggiunto a monostrati di cellule MDCK a concentrazioni tra 30 e 40µM. Concentrazioni apparentemente non tossiche (1µM-20µM) inducevano un incremento del GSSG di 1.5-2 volte rispetto alle cellule non trattate e, nel contempo, un aumento significativo del virus rilasciato dalle cellule infettate. Tale incremento, era correlato ad un aumento nell'espressione di specifiche proteine virali: la glicoproteina dell'envelope HA, le proteine nucleocapsidiche NP e P e la proteina di matrice M. Il trattamento con GSH 10mM e NAC 5mM provocava una riduzione della replicazione virale del 85% e 42% rispettivamente, rispetto alle cellule infettate e trattate con il metallo. I dati, nel complesso, mostrano che il platino può influenzare la replicazione virale modulando lo stato redox intracellulare. L'incremento della suscettibilità all'infezione virale potrebbe essere considerato come un ulteriore fattore di rischio per i soggetti esposti.

VALUTAZIONE DEL PROFILO MICROBIOLOGICO DI UN'ACQUA DI FALDA DELLA PROVINCIA DI CATANIA. RISCHIO SANITARIO ?

Maria Rita Pinizzotto, Marta Finocchiaro e Francesco Marino °.

ARPASicilia, Dipartimento Provinciale Catania, °Servizi Idrici Ambientali (S.Idr.A.), Catania.

Nell'ambito del progetto di ricerca "Le acque di falda: nuovi indicatori di qualità e rischio sanitario", promosso nel triennio 1999-2001 dall'Istituto Superiore di Sanità (Coordinatore dott.ssa Laura Volterra), il Dipartimento Provinciale di Catania dell'ARPASicilia ha studiato due importanti riserve ubicate su versanti opposti del vulcano Etna. Fra queste, la Galleria di emungimento nota come "Tavolone", attualmente gestita dalla S.Idr.A. (Servizi Idrici Ambientali) di Catania, rappresenta un interessante esempio di sistema misto di gallerie (80 m sotto il piano di campagna) e pozzi verticali (trivellati a partire dal piano di galleria), che attraversa per circa 3 Km i territori comunali di Aci S. Antonio, Viagrande, fino allo sbocco in territorio di Acicatena.

Le analisi microbiologiche sono state eseguite su campioni di acqua prelevati con cadenza stagionale direttamente in galleria e dalle stazioni di pompaggio "Stazzone" e "Odigitria", le cui acque scorrono poi lungo la stessa galleria sotterranea. Sui campioni prelevati, oltre ai comuni indicatori microbiologici di contaminazione fecale (che restano i punti cardine per la qualità igienica dell'acqua), sono stati determinati microrganismi indicati dal WHO (1993) "indesiderabili" o "fastidiosi", quali batteri filamentosi ferroprecipitanti, biofilmanti, nonché germi ambientali occasionalmente patogeni (*Aeromonas*) e *Pseudomonas* con potenzialità di ricrescita in rete, allo scopo di studiarne il potenziale significato come indicatori di qualità e vulnerabilità delle acque di falda.

Per quanto attiene la valutazione della flora microbica totale il protocollo di lavoro ha proposto, in alternativa al metodo classico della semina per inclusione, la enumerazione e la differenziazione di microrganismi ambientali che, in funzione dei contatti che il mondo sotterraneo ha avuto con l'ambiente epigeo, hanno potuto acquisire eventualmente resistenza agli antibiotici e/o capacità emolitiche. I risultati ottenuti consentono di formulare alcune interessanti ipotesi sulla provenienza di ceppi batterici risultati assenti nelle captazioni, - almeno nei volumi analizzati - e presenti invece nell'acqua trasportata in galleria e che da questa afferisce ai serbatoi idrici per la distribuzione.

VALUTAZIONE DEL TEST LiPA Rif. TB PER LA DIAGNOSI RAPIDA E DETERMINAZIONE DELLA RESISTENZA ALLA RIFAMPICINA DI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

F. Zara¹, P. Troupioti², R. Migliavacca¹, R. Brerra¹, E. Nucleo¹, M. Spalla¹, L. Pagani¹, E. Romero¹

¹Dip. di Microbiologia, Università di Pavia, ²Lab. Analisi Chim. Clin. e Microbiologia, AO E. Morelli, Sondalo (SO)

La rapida diagnosi di *M.tuberculosis* è essenziale per l'immediato trattamento dei pazienti. La diffusione di ceppi multiresistenti di *M.tuberculosis* rende necessaria la messa a punto di metodiche rapide per la determinazione della sensibilità ai farmaci anti-tubercolari. I metodi colturali, inclusi i sistemi automatici, richiedono un tempo spesso lungo per evidenziare la presenza di *M.tuberculosis* nel campione clinico. Il test LiPA Rif. TB (Innogenetics, Belgium) permette sia la ricerca diretta di *M.tuberculosis* complex sia la determinazione della sensibilità alla rifampicina nel campione clinico.

Obiettivo Abbiamo valutato l'utilità, la sensibilità e specificità del test LiPA Rif. TB in parallelo con le metodiche tradizionali ed il sistema automatico Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson, USA). Le colture dei campioni risultati negativi al test sono state sottoposte a LiPA Mycobacteria (Innogenetics) per l'identificazione dei MOTT.

Materiali e Metodi Nel periodo Maggio-Luglio 2002, 40 campioni clinici di provenienza respiratoria, raccolti e valutati mediante esame microscopico, coltura su Lowenstein-Jensen (Difco Laboratories, USA) e Bactec MGIT 960 presso l'Azienda Ospedaliera Morelli di Sondalo, sono stati studiati in parallelo con il test LiPA Rif. TB secondo le istruzioni d'uso. I campioni sono stati pretrattati con metodo NALC/NaOH.

Risultati Dei 40 campioni clinici considerati, 25 sono risultati positivi per *M.tuberculosis* complex al LiPA Rif. TB e successivamente positivi sia in coltura tradizionale sia con Bactec MGIT 960. Dei 25 campioni positivi alla ricerca diretta per *M.tuberculosis*, 20 (80%) risultavano sensibili alla rifampicina e 5 (20%) resistenti. Il test LiPA Rif. TB ha mostrato una perfetta concordanza con il Bactec MGIT 960, anticipandone il risultato mediamente di 10 giorni. Dei rimanenti 15 campioni negativi al LiPA Rif. TB, 13 sono risultati MOTT. 2 campioni sono risultati negativi con tutte le procedure. La metodica LiPA si è rivelata di semplice esecuzione, rapida e altamente sensibile e specifica.

Conclusioni I nostri risultati dimostrano che il test LiPA Rif. TB è attendibile per la rilevazione diretta di *M.tuberculosis* complex in campioni clinici respiratori e può essere considerato una valida e più rapida alternativa ai metodi tradizionali non molcolari per il saggio della sensibilità alla rifampicina di *M.tuberculosis*.

VALUTAZIONE DELLA ATTIVITÀ IN VITRO DI FOSFOMICINA- TROMETAMOLO NEI CONFRONTI DEI PRINCIPALI UROPATOGENI RESPONSABILI DI IVU NON COMPLICATE

S.Carnevale, D. Nicolosi, V. Catalano, A. Stivala, M.Torre

Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze ginecologiche - Università di Catania.

Le IVU non complicate rappresentano le patologie infettive più frequenti in comunità, specialmente nella donne dove, per motivi anatomici, è più facile una colonizzazione vaginale (e conseguentemente dell'apparato urinario) da parte di batteri intestinali.

Il trattamento empirico di tali soggetti è largamente utilizzato nella pratica medica ed è giustificato dal ristretto numero di germi responsabili e dalla conoscenza della loro antibiotico sensibilità. E' comunque importante che la classe medica abbia sempre a disposizione dati aggiornati e relativi al territorio sull'etiologia e l'antibiotico resistenza dei germi uropatogeni.

Abbiamo voluto verificare, quindi, l'attività dei chemioantibiotici più utilizzati nei confronti dei principali agenti eziologici di UTI (ciprofloxacina, co-amoxiclav (amoxicillina + acido clavulanico), co-trimossazolo (sulfametossazolo + trimetoprim), fosfomicina, nitrofurantoina, norfloxacina) nei confronti di 582 uropatogeni, isolati da urinocolture " significative" (con carica microbica superiore a 10⁵ cfu/ml) di soggetti con IVU non complicate.

Il germe maggiormente coinvolto in tali patologie è stato l'E.coli (430 ceppi, 74%), seguito da Klebsiella spp. (10.6%) e P.mirabilis e P. vulgaris (6.5%); tra i Gram-positivi è stata riscontrata la presenza di E.faecalis in 14 casi (2.4%) e di S.saprophyticus in un solo caso.

Il saggio di sensibilità in vitro ha confermato il dato internazionale di ottima efficacia di fosfomicina trometamolo nei confronti di tutti i patogeni urinari isolati ed in particolare di E.coli.

% di sensibilità in vitro in:

	582 uropatogeni	430 E.coli
fosfomicina	91.2	98.1
ciprofloxacina	88.7	89.8
norfloxacina	88.5	89
nitrofurantoina	82.3	95.4
co-trimossazolo	80.6	84.4
co-amoxiclav.	80.4	87.7

Come è ragionevole aspettarsi, l'attività dei due fluorchinoloni saggati (ciprofloxacina e norfloxacina) è molto simile e praticamente sovrapponibile. La nitrofurantoina si colloca al secondo posto quando la sua attività viene osservata soltanto contro E. coli, mentre essa scende al quarto posto quando la sua attività viene saggiata contro tutti i patogeni urinari isolati, risentendo di una sua minore attività nei confronti degli altri enterobatteri e di una scarsa attività nei confronti di Pseudomonas. Riteniamo, quindi, che l'ottima attività nei confronti dei principali patogeni urinari e la favorevole compliance della monoministerazione rendano la fosfomicina un chemioantibiotico di scelta nella terapia sia empirica che mirata delle UTI non complicate.

VALUTAZIONE DELLA PERDITA DELLA VITALITA' E DELLA CAPACITA' DI RESUSCITARE DALLO STATO VBNC DI CAMPYLOBACTER JEJUNI IN SPECIFICO MICROCOSMO.

Baffone W., Citterio B., Casaroli A., Vittora E., Pierfelici L., Patrone V.

Istituto di Scienze Tossicologiche Igienistiche ed Ambientali. Università di Urbino.

L'entrata in uno stato vitale ma non coltivabile (VBNC) in risposta a prolungate condizioni ambientali sfavorevoli e la capacità di recuperare la divisione al ripristino delle ottimali condizioni di crescita sono state individuate anche per *Campylobacter jejuni*. Il tempo di permanenza nello stato VBNC, inoltre, come osservato in altre specie microbiche, potrebbe influenzare la capacità rivitalizzante.

In questo lavoro vengono presentati i risultati relativi alla durata della vitalità in assenza di divisione di due stipiti di *Campylobacter jejuni* conservati a 4° in specifico microcosmo, costituito da acqua di mare sterile.

La doppia colorazione con CTC-DAPI, la conta diretta vitale (DVC) e la tecnica con anticorpo fluorescente sono state impiegate per il periodico monitoraggio della vitalità, mentre l'animale da laboratorio è stato utilizzato per la rivitalizzazione.

Il monitoraggio del microcosmo è stato effettuato per un periodo di circa 150 giorni. L'osservazione periodica ha evidenziato che il numero delle cellule vitali (valutate con la colorazione con CTC) si è mantenuto con valori pressochè vicini a quelli dell'inoculo iniziale (1,6x10⁶ batteri/ml) per circa 10 giorni conservando valori di 10⁴ fino al 60° giorno. Successivamente si è assistito ad una progressiva diminuzione ottenendo valori di 10³ batteri/ml intorno al 110° giorno e di 10² intorno al 120° giorno, per poi scomparire. La rivitalizzazione nel topo è stata tentata una prima volta con un microcosmo di 30 giorni in cui le cellule vitali presentano valori di 3,4x10⁴ ottenendo in questo caso l'isolamento batterico nel 30% degli animali infettati. Nei successivi tentativi effettuati al 60° (1,6x10⁴ batteri/ml), 90° (1x10³ batteri/ml) e 120° (7x10² batteri/ml) giorno di incubazione, isolamenti sono stati ottenuti solo con VBNC di 60 giorni (11,1% di animali infettati). Per entrambi gli stipiti è stato osservato analogo comportamento.

I risultati ottenuti indicano che *Campylobacter jejuni* è in grado di sopravvivere nell'ambiente acquatico in forma vitale ma non coltivabile per un periodo inferiore a 150 giorni e che la riattivazione nell'animale è possibile solo con una carica microbica di cellule vitali superiore a 10⁴ batteri/ml.

VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ DEGLI ALIMENTI MEDIANTE L'ANALISI MICROBIOLOGICA COMPARATA

G. Ottogalli

DiSTAM – Università degli Studi di Milano

In alcune pubblicazioni ed in particolare nella nota “Classificazione definizione dei microrganismi degli alimenti su base ecologica e funzionale” (Ottogalli, Ann. Microbiol. Enzimol. 42, 139-148, 1992) ho distinto i microrganismi in utili (protecnologici, probiotici), dannosi (alterativi, patogeni) e indifferenti o banali. Questa distinzione riveste notevole importanza quando si valuta un alimento in base alla carica microbica. Generalmente non si tiene conto, a mio avviso, di due fatti:

si cercano solo i microrganismi dannosi e non quelli utili (con eccezione dello yogurt) e comunque si ritiene che i microrganismi che si rilevano con gli usuali terreni colturali siano tutti da ascrivere alla prima categoria;

si valuta generalmente l'alimento sulla base delle analisi singole (esempio coliformi, stafilococchi, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*) e mai in maniera comparata come ho suggerito di fare (Correra e Ottogalli “Guida pratica di igiene e di legislazione”, Tecniche Nuove, Milano, 2001).

Anche in base a quanto suggerito sopra è così possibile dare una valutazione che, tenendo conto di più fattori, prospetti una differente gradualità di giudizi dell'alimento in esame:

A – Regolare, edibile

B, C – Edibile, sia pure declassato merceologicamente,

D, E – Richiede un supplemento di indagine,

F – Pericoloso,

G – Nocivo,

H – Alterato (Pericoloso / Nocivo a seconda del tipo di alterazione).

“EVOLUZIONE DEI FATTORI DI VIRULENZA NEGLI UROPATOGENI”

Gianna Tempera, Vito Mar Nicolosi

Dip. di Scienze Microbiologiche e Ginecologiche, Università di Catania

L'esito di una infezione urinaria (come del resto di qualsiasi infezione microbica) dipende dalle interazioni tra i fattori di virulenza del microrganismo e fattori biologici e comportamentali dell'ospite.

Anche i germi cosiddetti commensali che hanno dovuto adattarsi alla coesistenza con l'ospite senza arrecare nessun danno sono potenzialmente in grado di provocare un'infezione sulla base ad esempio di un deficit immunitario dell'ospite; ma solo i classici patogeni sono capaci di colonizzare (condizionatamente al tipo di ambiente), raggiungere più o meno rapidamente il “quorum sensing” attraverso la sintesi e la secrezione di autoinduttori (es. AHL nei Gram negativi) e successivamente avviare il processo infettivo attraverso l'espressione fenotipica dei geni di virulenza (biofilm, enzimi, tossine).

Il quorum sensing gioca un ruolo fondamentale nella patogenesi delle infezioni sostenute da ceppi uropatogeni di E.coli.

E' stata infatti dimostrata l'esistenza anche in E.coli di geni (LuxS) che innescano la produzione di “segnali chimici” la cui concentrazione aumenta parallelamente all'aumento della popolazione batterica che li produce. Solo quando viene raggiunta la concentrazione soglia, i germi attivano i fattori di virulenza responsabili della comparsa della sintomatologia; in tal modo evitano di allertare il sistema immunitario dell'ospite troppo precocemente concedendosi così maggiori possibilità di sopravvivenza.

La moderna microbiologia molecolare ha inoltre permesso la identificazione dei geni codificatori dei fattori di virulenza batterica, nonché l'analisi genetica della loro evoluzione.

E. coli è certamente il microrganismo più studiato; l'analisi dei fattori che hanno comportato l'acquisizione della virulenza in un batterio appartenente ad una specie altrimenti commensale, è favorita dalla possibilità di comparare ceppi K12 stabilmente avirulenti con i ceppi selvaggi che invece rappresentano esempi di microrganismi che un lentissimo processo evolutivo ha reso via via capaci di colonizzare competitivamente l'ambiente intestinale, di sopravvivere autonomamente nell'ambiente esterno fino ad arrivare ad esprimere un elevato potere patogeno.

Tutto ciò presuppone, almeno per alcuni tipi clonali di E.coli selvaggio, il riconoscimento di una relativa instabilità genomica e l'esistenza di siti cromosomiali suscettibili alla integrazione con nuove sequenze di DNA acquisito per trasmissione orizzontale da altre Enterobacteriaceae.

E.coli fornisce infatti un'eccellente dimostrazione dell'influenza che il trasferimento di blocchi di geni di patogenicità – le cosiddette isole di patogenicità (PAI)- abbia avuto sulla evoluzione della virulenza.

Nella maggior parte dei casi un determinato ceppo di E.coli patogeno è specificamente associato ad una sola delle diverse patologie (gastrointestinali, urinarie, meningiti, respiratorie) in conseguenza del tipo di percorso evolutivo che si ipotizza abbia intrapreso nel corso dei millenni: ceppi diversi emergono infatti parallelamente dai comuni ceppi commensali ancestrali per acquisizione orizzontale di differenti PAI (ad es. negli UPEC la acquisizione di PAI I contenente geni codificanti per emolisine e PAI II con geni per emolisi e P-fimbrie)

La migliore conoscenza del complesso meccanismo che regola la crescita batterica e l'espressione genetica dei fattori di virulenza in relazione anche con la risposta dell'ambiente ospite (starvation di nutrienti, produzione di ormoni, citochine) potrebbe in futuro portare allo sviluppo di vaccini o di nuovi chemioterapici, ma già da ora è la base per capire l'influenza positiva sull'esito di una infezione urinaria di E.coli dimostrata da alcuni antibiotici comunemente utilizzati nella terapia delle UTI.

VIBRIONI ISOLATI DA PESCI MARINI

Deriu Antonella, Usai Donatella, Sechi Leonardo A., Zanetti Stefania

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

Microrganismi appartenenti ai generi *Yersinia*, *Aeromonas* e *Vibrio*, sono gli agenti eziologici di malattie che causano epidemie mortali negli allevamenti di pesci d'acqua dolce e marina, con conseguenti gravi danni economici.

Negli ultimi anni sono stati pubblicati numerosi lavori riguardanti lo studio di microrganismi isolati da fauna ittica d'allevamento con manifesta patologia, mentre sembra essere molto scarsa la bibliografia riguardante lo studio su fauna selvatica. In questa prima fase della ricerca si sono valutati alcuni potenziali fattori di patogenicità, caratterizzando dal punto di vista fenotipico vibrioni isolati da pesci selvatici apparentemente sani.

Lo studio ha riguardato 20 ceppi di *Vibrio alginolyticus*, tre *Vibrio harveyi*, 2 *Vibrio parahaemolyticus*, 1 *Vibrio vulnificus* B2, 1 *Vibrio mediterranei* ed 1 *Vibrio diazotrophicus*, isolati da alici, merluzzi, sogliole, mormore e sgombri appena pescati. Sono stati eseguiti i seguenti test: saggio di sensibilità agli antibiotici, attività proteasica (skim milk e gelatina) adesione su Caco2, slime test e produzione di biofilm. Il 61% dei vibrioni erano sensibili alla ampicillina, il 50% hanno rivelato attività proteasica in skim milk mentre solo il 7% in gelatina, il 18% hanno determinato formazione di biofilm in piastre di polistirene. Infine il 37,5% dei *Vibrio* hanno mostrato capacità adesiva su cellule Caco2. Quest'ultimo risultato sembra essere il più interessante, infatti, i teleostei marini bevono continuamente acqua che potrebbe essere quindi veicolo di infezioni del tratto gastrointestinale. I risultati preliminari di questa ricerca stimolano ulteriori studi, mirati alla caratterizzazione fenotipica e genotipica dei suddetti ceppi e ad una comparazione fra ceppi isolati da fauna marina selvatica e d'allevamento.

IDENTIFICAZIONE MEDIANTE MULTIPLEX-PCR DI BATTERI PARODONTOPATOGENI IN CAMPIONI DI PLACCA SUBGENGIVALE

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

Diversi batteri sono oggi riconosciuti come possibili agenti eziologici delle parodontopatie.

Una multiplex-PCR, basata sulla ricerca del gene 16S dell'rRNA ribosomale, è stata usata per la determinazione della prevalenza di *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.), *Bacteroides forsythus* (B.f.), *Campylobacter rectus* (C.r.), *Eikenella corrodens* (E.c.), *Fusobacterium nucleatum* (F.n.), *Porphyromonas gingivalis* (P.g.), *Prevotella intermedia* (P.i.) e *Treponema denticola* (T.d.) nelle diverse forme di malattia parodontale.

Sono stati esaminati 60 campioni subgengivali ottenuti da 60 pazienti (20 con Parodontite Giovanile (Early-Onset Periodontitis, EOP), 20 con Parodontite cronica dell'adulto (Chronic Periodontitis, CP) e 20 soggetti sani) afferenti all'ambulatorio di Clinica Odontoiatrica del Policlinico "A. Gemelli" dell'Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma.

Eseguita l'estrazione degli acidi nucleici, i campioni sono stati analizzati mediante multiplex-PCR per la ricerca simultanea degli 8 batteri. Frammenti di amplificazione specifici di diverso peso molecolare per ciascun microrganismo sono stati rilevati mediante elettroforesi su gel di agarosio. La sensibilità della reazione è stata valutata mediante diluizioni limite di colture dei ceppi di riferimento e delle sequenze amplificate clonate in un opportuno vettore.

E' stata riscontrata una elevata correlazione tra la presenza dei batteri parodontopatogeni e le due diverse forme di malattia parodontale. In particolare, 4 batteri (A. a., E.c., P.g. e P.i.) hanno mostrato una prevalenza significativamente più elevata nei pazienti con EOP e CP rispetto ai soggetti sani. Inoltre, nel 70% dei casi i pazienti con EOP e CP sono risultati positivi per più di 4 batteri contemporaneamente, mentre nei soggetti sani tale percentuale si riduce al 30 %.

In conclusione, i risultati ottenuti mostrano come l'applicazione di una diagnostica molecolare altamente sensibile e specifica renda possibile l'identificazione rapida dei batteri maggiormente coinvolti nelle parodontiti, permettendo una corretta diagnosi eziologica e l'attuazione di una terapia mirata.

MODULAZIONE DELLA RISPOSTA TH1-TH2 IN CORSO DI INFEZIONI

Giuseppe Teti

Università di Messina

Il tipo di rapporto che si instaura tra i microrganismi e l'uomo ha un'influenza decisiva sulle malattie a flogosi allergica. Da un lato, un'adeguata colonizzazione da parte del microbiota autoctono previene l'insorgenza dell'asma, della rinite allergica e della sensibilizzazione atopica. Dall'altro, le infezioni respiratorie acute possono precipitare i fenomeni asmatici e causare ostruzione acuta delle vie aeree. Il dogma corrente tende a spiegare le influenze dei microrganismi sulla base di un dualismo tra le risposte di tipo 1 e tipo 2 (e cioè mediate, rispettivamente, da linfociti T helper di tipo 1, produttori di interferon gamma, o linfociti T helper di tipo 2, produttori di interleuchina 4).

I dati più recenti, tuttavia, indicano che questo modello è semplicistico. Un ruolo fondamentale sembra essere svolto da un terzo sottotipo di linfociti T con funzione immunosoppressiva, caratterizzato dalla produzione di citochine diverse da quelle dei T helper di tipo 1 o 2. Questo linfociti T "del terzo tipo", denominati cellule regolatrici (Tr), hanno un ruolo fondamentale nel prevenire fenomeni autoimmuni ed allergici. I Tr sono altamente specifici e possono essere indotti da svariati antigeni batterici, virali o protozoari. Queste cellule hanno tre distinti fenotipi che si associano ad altrettanti meccanismi immunoregolatori. Le cellule Tr di tipo 1 producono alti livelli di interleuchina 10 e bassi, o moderati, livelli di transforming growth factor beta. Le cellule Tr di tipo 3, al contrario, producono alti livelli di quest'ultima citochina. Un terzo tipo di cellule Tr, denominato CD4⁺ CD25⁺, viene caratterizzato in base a marker di superficie, e non in base al profilo di citochine prodotto. Queste cellule, che comprendono il 5-10% del pool periferico di cellule T, hanno una profonda azione immunosoppressiva mediata dalla loro capacità di inibire la produzione di IL-2.

Molti microrganismi, compreso il virus dell'epatite A e i batteri commensali del tratto gastro-intestinale, possono normalmente indurre lo sviluppo di cellule Tr che limitano la flogosi allergica delle mucose e promuovono la tolleranza agli allergeni respiratori ed alimentari. In mancanza di questi stimoli infettivi, al posto delle cellule Tr, si sviluppano cellule T helper di tipo 2, che sono connesse alle prime dal punto di vista dell'origine cellulare. Viene così a formarsi un numero eccessivo di cellule Th di tipo due che coordinano lo sviluppo di fenomeni di flogosi allergica attraverso la liberazione di interleuchine 4, 5, 9 e 13.

SEQUENZIAMENTO DEL GENOMA DI *MYCOPLASMA HOMINIS*: I. STRATEGIE PER IL CLONAGGIO E CREAZIONE DELLA BANCA COSMIDICA

M.P. Musumarra¹, M.R. Milioti¹, C. Catra¹, F. Butera¹, P. Di Pietro¹, F. Maugeri¹, M.G. Crispino¹, G. Rappazzo², P.M. Furneri¹

¹Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche e ²Dipartimento di Biologia Animale, Università di Catania

La perdita della parete cellulare distingue i micoplasmi dagli altri procarioti, per tale motivo essi sono classificati in un gruppo tassonomico distinto detto appropriatamente classe *Mollicutes*. Essi possiedono una membrana cellulare a tre strati ma non una parete rigida, e quindi tendono ad essere pleomorfi. La forma vivente più piccola ha un diametro di circa 300 nm, e anche se non sono dotati di pili o di flagelli molti sono mobili. La crescita nei terreni nutritivi avviene in assenza di cellule viventi. Il loro habitat naturale include mammiferi, uccelli, rettili, artropodi, piante e pesci. Tra le oltre 125 specie fino ad oggi note, quelle che più direttamente interessano la patologia umana non sono più di sei, contraddistinte da caratteristiche di patogenicità tali da suggerire meditate valutazioni differenziali. *M.hominis* è membro delle comunità residenti dell'apparato genitale maschile e femminile e il loro intervento come causa di malattia è esclusivamente di tipo opportunistico. *M.hominis* è coinvolto nelle febbri post-partum e post-abortum, nella malattia infiammatoria pelvica, nell'endometrite, nella corionamnionite, nella pielonefrite, nella prostatite e nella vaginosi. E' naturalmente resistente ai macrolidi.

Le peculiari caratteristiche di tale microrganismo ci hanno indotto a voler sequenziare l'intero genoma per utilizzarlo come modello biologico. Sono scelte due differenti strategie: a) realizzazione di uno studio pilota con banca plasmidica in pUC19; b) creazione di una banca cosmidica in XL1 blue MRF'.

Attualmente abbiamo realizzato una banca cosmidica di alcune centinaia di cloni che, permetterebbero una copertura del genoma di *M.hominis* (circa 800 Kb) maggiore di 5 volte.

LA TAVOLA PERIODICA DEI FORMAGGI

G. Ottogalli

DiSTAM – Università degli Studi di Milano

Il settore caseario è rimasto caratterizzato da normative e classificazioni per molti versi obsolete, che a mio avviso andrebbero aggiornate. In questa ottica ho elaborato alcune proposte. Tale impostazione è riassumibile in due schemi di classificazione. Il primo esposto nella Tavola periodica dei formaggi (versione sintetica) che prevede la suddivisione in 8 classi e 45 famiglie e che è rivolta soprattutto al consumatore (G. Ottogalli, Atlante dei formaggi, Ed. Hoepli, Milano, 2001). Il secondo schema di classificazione destinato soprattutto agli addetti ai lavori, esposto nella Tavola periodica dei formaggi (versione globale), prevede una ripartizione in 9 classi e 81 famiglie.

Lo scopo di queste proposte rientra nella filosofia di mie precedenti pubblicazioni ed è riassumibile in due concetti principali: cercare di venire incontro al consumatore, permettendogli, attraverso un linguaggio possibilmente chiaro ed una maggiore trasparenza delle etichettature, di riconoscere e scegliere i prodotti più rispondenti alle sue esigenze; stimolare i produttori a migliorare la tecnologia e l'igiene ed a formulare nuovi tipi di formaggi conformi ai modelli di una moderna alimentazione.

ANALISI FENOTIPICA DI ISOLATI CLINICI DI *NEISSERIA MENINGITIDIS* NATURALMENTE DIFETTIVI NEL SISTEMA DI RICOMBINAZIONE RECBCD

C. Pagliarulo¹, R. Colicchio¹, M. Tredici², G. Cantalupo¹, M. Bardaro¹, P. Salvatore¹, A. Lavitola¹, C. Bucci², C.B. Bruni¹ e P. Alifano².

1) Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano", Università degli Studi di Napoli "Federico II";

2) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche e Ambientali, Università degli Studi di Lecce.

In questo studio abbiamo dimostrato che i ceppi di *N. meningitidis* appartenenti alla linea ipervirulenta ET-37 ed alcuni ceppi filogeneticamente distinti sono estremamente sensibili ai raggi UV (254 nm). Il fenotipo risultante è una conseguenza della presenza di un allele *recB*^{ET-37} non funzionale a causa di mutazioni *missense*. L'analisi fenotipica è stata effettuata in ceppi congenici di meningococco che contenevano sia il gene *recB* selvatico che l'allele difettivo *recB*^{ET-37}. I ceppi congenici *recB*^{ET-37}, oltre ad essere sensibili ai raggi UV, sono risultati difettivi sia nella capacità di riparare le lesioni del DNA indotte dai raggi UV, che nella ricombinazione nel corso del processo di trasformazione naturale. In accordo con questi dati, abbiamo dimostrato che l'allele *recB* selvatico di *N. meningitidis*, ma non l'allele *recB*^{ET-37} era in grado di complementare la mutazione *recB21* di *Escherichia coli* in un saggio di ricombinazione *in vivo*. Sebbene il tasso di mutazione spontanea fosse comparabile nei meningococchi con l'allele *recB* selvatico e in quelli con l'allele difettivo, soltanto in questi ultimi si osservava un aumento della frequenza di mutazione in seguito a irradiazione con UV. Per esaminare l'effetto della presenza dell'allele *recB* difettivo sui meccanismi di variazione antigenica, è stato sviluppato un saggio basato sulla PCR capace di misurare la frequenza di eventi di ricombinazione a livello dei loci codificanti le piline. I risultati hanno dimostrato che la presenza dell'allele *recB*^{ET-37} determina un aumento considerevole della frequenza di ricombinazione.

I nostri dati rafforzano, pertanto, le recenti teorie che la presenza di alleli difettivi in geni di ricombinazione e riparazione del DNA non costituiscono un'eccezione in natura. Questi alleli, o la loro combinazione, hanno un ruolo importante nell'evoluzione del fenotipo patogeno, influenzando la mutabilità generale, o la frequenza degli scambi genetici. Essi inoltre intervengono modulando l'efficienza di sistemi di variazione specializzati, come la variazione di fase e la variazione antigenica, che giocano un ruolo importante anche nel corso di un singolo ciclo infettivo.

“ STUDIO LONGITUDINALE SULLA EFFICACIA DI FOSFOMICINA TROMETAMOLO IN MONOSOMMINISTRAZIONE NELLA RISOLUZIONE CLINICA E NELL'ERADICAZIONE DI UROPATOGENI RESPONSABILI DI CISTITI NON COMPLICATE”

Roberto Mattina e *Gianna Tempera

*Istituto di Microbiologia, Università di Milano e *Dip. di Scienze Microbiologiche e Ginecologiche
Università di Catania*

Lo studio è stato condotto allo scopo non soltanto di conoscere la prevalenza e la antibiotico-resistenza dei patogeni urinari responsabili di cistiti non complicate, ma anche di verificare se la monosomministrazione di Fosfomicina trometamolo in tali soggetti è in grado di determinare sia la precoce guarigione clinica che l'eradiazione microbiologica in un successivo controllo.

Sono stati arruolati nello studio i primi (in ordine cronologico) 20 soggetti che si sono presentati alla osservazione di 20 Medici di Medicina Generale (10 operanti in Lombardia e 10 in Sicilia) con infezione non complicata delle vie urinarie, sia primaria che ricorrente ed in cui è stato possibile effettuare:

la conferma microbiologica della diagnosi clinica (urinocoltura quantitativa e qualitativa)

una terapia con monosomministrazione di Fosfomicina trometamolo

un follow up clinico/microbiologico dopo 8-10 gg dalla fine della terapia

Dei 400 soggetti arruolati (nell'82% donne, in età compresa tra i 16 e gli 85 anni), 274 (68.5%) erano affetti da cistite acuta al primo episodio.

germe isolato alla urinocoltura basale	cistite al primo episodio	cistite ricorrente
E.coli 312 (78%)	236	76
Klebsiella spp. 32 (8%)	14	18
Proteus spp. 20 (5%)	6	14
C.freundii 16 (4%)	4	12
Enterococcus spp. 12 (3%)	8	4
Pseudomonas spp. 8 (2%)	6	2

La guarigione clinica è stata ottenuta nel 100% dei casi ed in nessun caso sono stati riferiti effetti collaterali indesiderati.

La eradiazione microbiologica veniva dimostrata in 372 soggetti (93%), ma raggiungeva il 95% nei casi in cui l'infezione era sostenuta da E.coli (296 casi/312).

I risultati ottenuti confermano che la Fosfomicina trometamolo per le sue peculiari caratteristiche è particolarmente indicata nel trattamento di breve durata delle UTI non complicate, assicurando il vantaggio di una efficacia clinica e microbiologica e un'ottima compliance.

ERTAPENEM: PROFILO FARMACOCINETICO

A. Novelli

Dipartimento di Farmacologia, Università degli Studi di Firenze

Negli ultimi decenni sono stati sviluppati derivati carbapenemici con varie sostituzioni nella struttura chimica di base che comportano differenze nello spettro di azione o nelle caratteristiche cinetiche delle diverse molecole. In particolare, l'ertapenem è un nuovo derivato 1 β -metil carbapenemico, resistente alla deidropeptidasi renale (DHP-I), caratterizzato da un meccanismo di azione prevalente sulle PBP 2 e 3, da un ampio spettro e da una lunga semivita di eliminazione.

Dopo somministrazione endovenosa di 1g nel volontario sano, si osservano concentrazioni plasmatiche al termine della infusione comprese tra 145 e 175 mg/l, con una semivita di eliminazione dal compartimento plasmatico di 3,8-4,4 ore ed una clearance plasmatica di 27-30ml/min. L'ertapenem ha un elevato legame farmacoproteico, concentrazione-dipendente, valutabile nel 92-95% circa per concentrazioni pari od inferiori a 150mg/l. La diffusione nel liquido interstiziale è comunque buona con un indice di penetrazione del 61%, ottenuto con il modello della bolla cutanea da suzione. La biodisponibilità dopo somministrazione intramuscolare è pressoché totale e tale via può rappresentare una valida alternativa all'uso endovenoso. Il derivato carbapenemico non è metabolizzato a livello epatico ed è eliminato principalmente attraverso l'emuntorio renale, per filtrazione glomerulare e secrezione tubulare (circa 80% della dose), sia immutato (nel 45% circa) che come metabolita idrolizzato. Nel 10% circa è eliminato per escrezione biliare. Nel paziente anziano i livelli plasmatici tendono ad essere più elevati rispetto al giovane, senza tuttavia la necessità di un aggiustamento posologico che è invece richiesto in caso di insufficienza renale moderata o grave. La somministrazione parenterale di 1g (e.v. od i.m.) comporta il mantenimento di concentrazioni superiori a 4mg/l per un periodo di tempo di 17-18 ore nel sangue e di oltre 24 ore nel liquido di bolla, con concentrazioni urinarie relative al periodo delle 12-24 ore dalla dose, comprese tra 40 e 55mg/l. Sulla base delle caratteristiche farmacocinetiche e delle correlazioni dinamico-cinetiche l'ertapenem si dimostra particolarmente efficace in monosomministrazione giornaliera nel trattamento di infezioni sostenute da specie patogene Gram-positive e Gram-negative comprese nello spettro di azione.

UTI NON COMPLICATE:

LA SCELTA TERAPEUTICA IN ITALIA: IL PUNTO DI VISTA DEL FARMACOLOGO

A. Novelli

Dipartimento di Farmacologia, Università degli Studi di Firenze

Le infezioni urinarie non complicate riconoscono una etiologia batterica riconducibile prevalentemente ad *Escherichia coli* od *Enterococcus sp.* e solo in misura minore ad altre enterobatteriacee o stafilococchi.

Negli anni vi è una tendenza ad un aumento delle resistenze nei confronti degli antibiotici più usati o comunque più efficaci, sia per quanto riguarda le specie Gram-negative che per le Gram-positive. Pertanto è necessario utilizzare le varie classi di antibiotici nel modo migliore possibile, tenendo conto in particolare delle diverse caratteristiche farmacodinamiche e farmacocinetiche delle varie molecole in uso.

I principali schemi terapeutici per il trattamento delle infezioni urinarie non complicate prevedono l'impiego di chinoloni, betalattamine e cotrimoxazolo tutti per via orale, in genere con una durata di 3 giorni, anche se è possibile utilizzare nella cistite la monosomministrazione con chinoloni, cotrimoxazolo e fosfomicina come sale monobasico con trometamolo.

Con riferimento alle betalattamine, nelle infezioni urinarie si impiegano prevalentemente le aminopenicilline in associazione ad inibitori suicidi (ad. es. amoxicillina-acido clavulanico) o le cefalosporine orali di terza generazione, anche se non sono attive nei confronti dell'enterococco. Inoltre, molte cefalosporine non hanno una biodisponibilità orale elevata e devono essere somministrate come profarmaci (esteri vari) e tutte (ad esclusione in parte del cefixima e del ceftibuten) hanno una semivita di eliminazione relativamente breve che ne sconsiglia la monosomministrazione giornaliera.

La fosfomicina è un ulteriore antibiotico attivo sulla parete batterica, ad un livello iniziale e quindi precedente a quello proprio delle betalattamine. Nonostante i possibili meccanismi di resistenza utilizzabili dal batterio, questo antibiotico tende a mantenere una buona attività nei confronti delle principali specie batteriche responsabili di infezione urinaria. Dopo assunzione orale come fosfomicina-trometamolo, si hanno concentrazioni urinarie elevate che si mantengono superiori a 100mg/l per almeno 30-40 ore, garantendo così una buona efficacia nel trattamento delle forme non complicate anche dopo una singola somministrazione.

Il cotrimoxazolo è sempre meno usato per motivi di chemioresistenza, in costante aumento, e di tollerabilità. Infine, i fluorochinoloni sono generalmente molto efficaci, ma proprio per le loro caratteristiche microbiologiche, farmacologiche e tossicologiche dovrebbero essere impiegati nelle forme più gravi e/o in popolazioni speciali.

HELICOBACTER PYLORI IN AMBIENTE MARINO

L. Cellini¹, A. Del Vecchio², M. Di Candia¹, E. Di Campli¹, B. Filareto², G. Donelli³

¹Dipartimento di Scienze Biomediche, Facoltà di Medicina, Chieti – ²Agenzia Regionale per la Tutela dell'Ambiente, Pescara

³Dipartimento di Ultrastrutture, Istituto Superiore di Sanità, Roma

l.cellini@dsb.unich.it

Razionale. Il meccanismo di trasmissione di *Helicobacter pylori*, responsabile di molte patologie a carico del tratto gastroenterico, a tutt'oggi non risulta ben definito e alcuni studi epidemiologici suggeriscono l'acqua come possibile via di trasmissione. L'obiettivo di questo studio è stato quello di rilevare attraverso nested-PCR la presenza del germe, in forma libera o associata a organismi planktonici, in campioni di acqua di mare.

Metodi. Sono stati effettuati campionamenti mensili sulla costa abruzzese nell'arco di un anno in una stazione di prelievo in cui sono stati monitorati ossigeno disciolto, pH, clorofilla, temperatura e salinità. E' stata, inoltre, effettuata la raccolta dello zooplankton attraverso prelievo a strascico con retino WP-2 a maglie di 200 mm. *H.pylori* associato al plankton è stato cercato in campioni di acqua di mare mediante filtrazione su membrane di nylon di 200 mm e 64 mm; la successiva filtrazione a 0,22 mm ha consentito di valutare la presenza del germe in forma libera. Dai campioni recuperati dai filtri è stata effettuata l'estrazione del DNA a diversi livelli di purificazione per la successiva amplificazione, mediante nested-PCR, di un frammento del gene *ureC*. Nel DNA estratto dai campioni positivi in nested-PCR è stata valutata la presenza del gene *cagA* come indicatore di patogenicità.

Risultati e Conclusioni. La sensibilità del saggio in nested-PCR è stata valutata in 62 UFC di *H.pylori* per 100 ml di un campione di acqua contenente 450 coliformi totali, 20 coliformi fecali e 60 Enterococchi. *H.pylori* è stato rilevato in 7 dei 12 campionamenti effettuati, sia nella forma libera che associato ad organismi planktonici classificati nei due maggiori gruppi di Cladoceri e Copepodi. In particolare, il batterio è stato identificato in forma libera nel periodo estivo, in correlazione a valori elevati di coliformi totali. Inoltre, in tutti i campionamenti estivi (giugno, luglio, agosto e settembre) ed in novembre, dicembre e marzo, il saggio in nested-PCR è risultato positivo per la ricerca del germe adeso al plankton. In nessun campione positivo è stata rilevata la presenza del gene *cagA*.

I dati raccolti in questo studio forniscono evidenze della presenza di *H.pylori* libero ed associato alle cellule planktoniche in acqua di mare, suggerendo, per questo ambiente, un potenziale ruolo di serbatoio naturale del microrganismo.