

# 33<sup>o</sup> Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia

Napoli, 16 - 19 Ottobre 2005



*Riassunti*

## L'AZIONE DEGLI ANTIBIOTICI SUI BATTERI IN FASE DI NON COLTIVABILITÀ\*

Dennis Benedetti\*, Maria Carla Tafi, Maria del Mar Lleo, Pietro Canepari  
Dipartimento di Patologia, Sezione di Microbiologia, Università di Verona

E' stato suggerito che il trattamento antibiotico, così come altre condizioni avverse incontrate dai batteri in particolari ambienti, potrebbe non eliminare completamente le cellule batteriche alcune delle quali potrebbero sopravvivere attivando lo stato vitale ma non coltivabile (VBNC). Il coinvolgimento di batteri non coltivabili in casi non diagnosticati di infezione ed in casi d'infezioni ricorrenti è stato proposto da alcuni autori studiando particolari tipi d'infezione nell'uomo e negli animali. Al fine di sviluppare nuove e migliori terapie sia per le infezioni ricorrenti sia per quelle ad eziologia sconosciuta, la patogenesi delle malattie da infezioni deve essere completamente conosciuta, incluso il ruolo dei batteri in stato di non coltivabilità, e approntata una terapia efficace anche nei loro confronti.

L'attivazione da parte dei microrganismi di meccanismi di sopravvivenza in ambienti avversi, come la mancanza di nutrienti oppure l'inglobamento all'interno di biofilm, conferisce ai batteri una particolare refrattarietà alla terapia antibiotica per la stentata diffusione del farmaco e per la trasformazione in forme inusuali di sopravvivenza come le cellule "affamate" e le forme batteriche "vitali ma non coltivabili". Inoltre, è stato dimostrato che i batteri che sopravvivono ad un qualsiasi tipo di stress sviluppano anche resistenza a numerosi altri tipi di stress e tra questi anche quello rappresentato dalla presenza di molecole di antibiotico.

In questo studio è stata analizzata la risposta di forme batteriche vitali ma non coltivabili di *Enterococcus faecalis* alla azione di diversi antibiotici quali la penicillina G, la piperacillina e la vancomicina. Dal momento che le forme VBNC dei batteri non crescono formando colonie, l'azione degli antibiotici utilizzati sulle cellule batteriche VBNC è stata valutata attraverso il monitoraggio della loro capacità di recuperare la divisione mediante un processo di "resuscitation". Alcune cellule della popolazione VBNC di enterococco possono resuscitare quando vengono mantenute a temperature adeguate e aggiunte dei nutrienti mancanti nell'ambiente oligotrofico. Al contrario, tali cellule non sono in grado di recuperare la capacità di resuscitare se vengono trattati con concentrazioni sufficienti di antibiotico per circa 24 ore. Sebbene i dati ottenuti non consentano di dimostrare l'uccisione delle cellule VBNC di *E. faecalis*, essi indicano che è possibile individuare concentrazioni di antibiotico sufficienti per inibire il processo di resuscitation impedendo alle cellule vitali ma non coltivabili di recuperare la capacità di dividersi ed esprimere il proprio potenziale patogeno.

## Olea europaea L.: ATTIVITÀ ANTIMICROBICA ED EFFICACIA DI CONSERVAZIONE

Blandino G. 1, Milazzo I. 1, Costanzo R. 1, Bonina F. 2 e Iauk L. 1

1 Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche, Università di Catania.

2 Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Catania.

L'olivo (*Olea europaea* L.) è la pianta più intimamente legata alla storia dei paesi del Mediterraneo ed oltre che in campo alimentare viene, oggi, utilizzata in cosmetologia e in campo farmaceutico.

In campo cosmetico vi è una crescente richiesta da parte dei consumatori di prodotti sempre più naturali. I preservanti antimicrobici dei prodotti cosmetici sono quasi esclusivamente di natura sintetica e questi sono spesso causa di reazioni cutanee allergiche nei consumatori. Il presente lavoro si propone di valutare il profilo antimicrobico e l'efficacia della conservazione antimicrobica di estratti di foglie di *Olea europaea* L. nei confronti di batteri e miceti che potenzialmente possono contaminare preparazioni farmaceutiche per uso topico.

L'attività antimicrobica di tre estratti diversamente ottenuti di foglie di olivo è stata valutata mediante la determinazione della Minima Concentrazione Inibente (NCCLS, 2004). L'efficacia della conservazione antimicrobica di tali estratti è stata saggiata su un campione di crema mediante il metodo del challenge test (FUI, XI Ed.). Come previsto dalla Farmacopea Italiana il test è stato eseguito su ceppi standard di *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans* ed, inoltre, su ceppi delle stesse specie di origine clinica. Parallelamente a questo test sulla stessa crema abbiamo eseguito altri due challenge: uno sul campione senza alcun conservante e uno sul campione preservato con una miscela di conservanti di sintesi (UBF 0,4%).

Le MIC hanno mostrato che gli estratti in esame sono dotati di attività antimicrobica nei confronti di *S. aureus* ed *E. coli* ed in particolare nei confronti di *C. albicans*; invece, hanno una scarsa attività nei confronti di *P. aeruginosa*.

Il challenge test ha dimostrato che l'estratto di foglie di *Olea europaea* L. al 2% addizionato come conservante nella crema testa riduce l'inoculo microbico effettuato con i ceppi di *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*, soddisfacendo i criteri A previsti dalla FUI. Nel saggio condotto con *P. aeruginosa* pur ottenendo una riduzione dell'inoculo, non vengono soddisfatti i criteri richiesti dalla FUI. Inoltre, i saggi effettuati sui ceppi standard e su quelli clinici danno risultati praticamente sovrapponibili.

In conclusione, composti naturali come gli estratti di *Olea europaea* L., dotati di buone proprietà antimicrobiche, possono essere presi in considerazione come agenti conservanti nella preparazione di prodotti dermocosmetici.

## ATTIVITA' PROTEASICA DI CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS: INDAGINI MOLECOLARI E FUNZIONALI

Carlotta F. Orsi<sup>a</sup>, Marcello Pinti<sup>b</sup>, Andrea Cossarizzab, Cristina Mussini<sup>c</sup>, Elisabetta Blasia

<sup>a</sup> Dipartimento di Scienze Igienistiche, Microbiologiche e Biostatistiche, <sup>b</sup> Dipartimento di Scienze Biomediche; Università di Modena-Reggio Emilia. <sup>c</sup> Azienda Policlinico di Modena, Clinica Malattie Infettive

**Introduzione:** Abbiamo precedentemente dimostrato che l'inibitore delle proteasi (PI) virali indinavir (IND) è in grado di agire direttamente su *C. neoformans* (Cn) inibendone la crescita e aumentandone la suscettibilità alla fagocitosi e al killing da parte dei fagociti. E' stato pertanto ipotizzato che in Cn esistano delle aspartil proteasi (AP), sensibili ai PI e importanti per la patogenicità del fungo stesso. Abbiamo infatti identificato, caratterizzato e purificato una AP di Cn (CnAP1), che in questo studio è stata ulteriormente caratterizzata anche a livello di trascrizione; abbiamo inoltre identificato un'altra AP di Cn (CnAP2).

**Materiali e metodi:** CnAP1 è stata purificata con il kit Ni-NTA Spin kit (QIAGEN). La sua attività proteasica è stata misurata con il kit "EnzCheck protease assay kit" (Molecular probes). I saggi di real time PCR con sonde Taqman sono stati effettuati mediante iCycler (Biorad) o Gene Analyzer 7000 (ABI Prism). La seconda AP di Cn (CnAP2) è stata identificata per omologia di sequenza nei database del progetto genoma di Cn.

**Risultati:** L'attività enzimatica di CnAP1 è risultata insensibile oltre che a IND anche a lopinavir (LPV). Considerando che tale insensibilità potrebbe essere dovuta all'interferenza delle 6His di CnAP1 con il riconoscimento farmaco-proteina, abbiamo riclonato il cDNA di CnAP1 in un vettore (pQE30Xa) che permette l'eliminazione della coda. Abbiamo poi valutato il livello trascrizionale della proteasi endogena da parte di CnH99, in diverse condizioni di coltura, osservando un incremento significativo dell'espressione di CnAP1, dopo 24 ore di crescita in minimal medium. Abbiamo infine iniziato la caratterizzazione della CnAP2: il cDNA completo è di 1933 pb e codifica per una proteina di 490 AA. Il gene comprende 7 esoni e 6 introni.

**Conclusioni:** L'attività enzimatica di CnAP1 sembra non essere influenzata né da IND né da LPV; conclusioni definitive potranno essere tratte solo dopo l'analisi della proteina senza coda di 6His. L'espressione di CnAP1 endogena sembra inducibile. Esiste una seconda AP in Cn, che potrebbe costituire il reale target dei PI in questo fungo.

Studio parzialmente finanziato dal Progetto ISS-Infezioni Opportunistiche e TBC derivanti dall'AIDS (n. 50D.22 a C.M).

## INFEZIONE DI CELLULE ENDOTELIALI CON HERPESVIRUS UMANO 8.

Elisa Borghi<sup>1</sup>, Renato Biffi<sup>1</sup>, Roberta Mancuso<sup>1</sup>, Romina Mazziotti<sup>1</sup>, Livianna Speciale<sup>1</sup>, Pasquale Ferrante<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio di Medicina Molecolare e Biotecnologie - Fondazione Don C. Gnocchi, IRCCS, <sup>2</sup>Cattedra di Virologia, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università di Milano, Italia.

L'Herpesvirus umano 8 (HHV-8) è presente a livello delle lesioni cutanee di tutti i pazienti con Sarcoma di Kaposi (KS) ed è essenziale per lo sviluppo della patologia. Le cellule affusolate o spindle cells, che caratterizzano le lesioni tumorali, sono di origine endoteliale. Sebbene per la produzione di particelle virali infettanti sia necessaria una replicazione litica, la maggior parte delle spindle cells presenta un'infezione di tipo latente, suggerendo che i geni latenti siano sufficienti per il mantenimento dell'infezione virale e lo sviluppo di KS.

Al fine di poter studiare il ruolo di fattori virali e cellulari coinvolti nello sviluppo e nella progressione di KS, abbiamo messo a punto un sistema di infezione riproducibile, utilizzando la linea cellulare endoteliale HMEC (Human Microvascular Endothelial Cells). Per l'infezione sono state utilizzate particelle virali purificate dalla linea BCBL-1 e l'efficienza è stata valutata mediante PCR, Western Blot e microscopia confocale.

Nelle cellule infettate con HHV-8, l'attività mitocondriale e la vitalità cellulare, monitorate a 24 e 48 ore post infezione mediante test colorimetrico MTT, sono risultate ridotte rispetto alle cellule di controllo. Le cellule infette sono state mantenute in coltura per 3 settimane e la proliferazione cellulare è stata misurata mediante conta delle cellule vitali con colorazione in tripan blu; le cellule positive per HHV-8 mostrano un tasso di crescita più elevato rispetto al controllo non infetto. La produzione di endotelina-1 e del suo precursore (Big endotelina-1), valutata nel surnatante cellulare, non mostra differenze legate all'infezione; si osserva però un aumento temporale del precursore.

I risultati ottenuti mostrano una ridotta attività mitocondriale immediatamente dopo l'ingresso, suggerendo così uno stress virus-correlato durante le prime fasi dell'infezione. Tuttavia, una volta stabilito lo stato di latenza, il virus HHV-8 sembra interferire con il meccanismo di regolazione del ciclo cellulare, promuovendo la proliferazione e la trasformazione cellulare.

Nel complesso, l'utilizzo della linea HMEC ci ha permesso di mettere a punto un buon modello di infezione latente con HHV-8, in cui è possibile dimostrare l'espressione dell'antigene virale LANA anche dopo passaggi dall'infezione. Studi futuri si focalizzeranno sulla possibilità di indurre la replicazione virale in questo sistema.

## **INFLUENZA DI ALIMENTI FUNZIONALI SULLA FLORA SALIVARE UMANA**

Gloria Burlacchini, Caterina Signoretto, Franco Bianchi e Pietro Canepari

*Dipartimento di Patologia, Sezione di Microbiologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Verona.*

Studi recenti hanno dimostrato che alcune molecole di origine alimentare sono in grado di influire sulle capacità di adesione dei batteri ai tessuti dell'ospite. L'adesione ai vari substrati è il primo passaggio critico della colonizzazione batterica. In vari alimenti quali caffè, caffè d'orzo, tè, vino, succo di mirtillo sono contenute sostanze che possiedono attività inibente il processo di adesività batterica alla superficie dentale. In particolare, sono stati identificati e purificati alcuni componenti appartenenti alla famiglia dei polifenoli, (catechine, trigonellina, acidi nicotinico e clorogenico) che hanno mostrato attività inibitoria nei confronti di vari enzimi batterici quali le glucosiltransferasi di *S. mutans* e di *S. sobrinus*. L'osservazione in vitro degli effetti di queste bevande sulle capacità adesive nei confronti di vari batteri ha portato a considerare una loro possibile influenza sulla flora batterica salivare di individui che abitualmente includono tali bevande nella loro dieta. In questo lavoro noi abbiamo valutato la composizione microbica della saliva di soggetti con differenti abitudini alimentari (consumo quotidiano di caffè, o di vino o di tè, o caffè d'orzo) al fine di studiare se anche in vivo i polifenoli contenuti negli alimenti/bevande interferiscono sulle capacità adesive dei batteri orali. Allo scopo sono stati reclutati 53 individui di età compresa tra i 19 e i 69 anni che abitualmente fanno uso degli alimenti/bevande oggetto di studio e altri 17 che abitualmente non consumano tali bevande (controlli). I campioni di saliva dei vari soggetti, raccolti mensilmente, per alcuni mesi, sono stati seminati su differenti terreni al fine di valutare la carica microbica totale (agar sangue), la carica streptococcica (mitis-salivarius agar), la carica di streptococchi mutans (Gold agar) e di lattobacilli (Rogosa agar). I risultati ottenuti hanno mostrato che nei soggetti controllo la carica microbica totale era sempre più elevata rispetto ai soggetti che facevano uso delle bevande oggetto di studio, mentre i consumatori abituali di caffè, tè, vino e caffè d'orzo, mostravano più bassi conteggi di streptococchi orali, di *S. mutans* e di lattobacilli. È quindi possibile ipotizzare che i polifenoli contenuti nei vari alimenti possono interferire sulle capacità adesive dei batteri del cavo orale e svolgere una possibile azione protettiva nei confronti di patologie orali ad eziologia microbica.

## **ANALISI DELL'ESPOSIZIONE SEQUENZIALE A FARMACI ANTIMICROBICI IN BIOFILM MISTI**

Buscema M.G., Oliveri S., Russo G., Nicoletti G.

*Azienda Ospedaliero Universitaria Policlinico di Catania*

*Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche*

*Università di Catania*

Obiettivo di questo studio è stato quello di valutare gli effetti dell'esposizione sequenziale di farmaci su biofilm misti costituiti da lieviti e batteri formati anch'essi in sequenza.

Sono stati utilizzati due ceppi di lievito, *C. albicans* e *C. parapsilosis*, insieme con due ceppi di stafilococchi produttori di slime, denominati ST1 e ST5, isolati tutti da CVC. Come ceppi di controllo *C. albicans* ATCC 76615 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. La formazione dei biofilm è stata effettuata in brodo TSB (tryptic soy broth), che garantisce una adeguata crescita sia dei batteri che dei lieviti. Nello specifico, sul biofilm di lievito è stato fatto aderire il biofilm batterico e viceversa, esponendo gli stessi biofilm sequenzialmente a due farmaci, la gentamicina e la caspofungina. Questi farmaci sono stati scelti per la differente attività manifestata nei confronti dei ceppi da noi utilizzati. La gentamicina è stata utilizzata alla concentrazione di 64 µg/ml e la caspofungina a 4 µg/ml. I saggi sono stati eseguiti in piastre per microtitolazione a 96 pozzetti. Per la valutazione dell'attività della caspofungina il TSB è stato sostituito da brodo RPMI. La quantificazione degli effetti dei farmaci saggiati è stata eseguita con l'ausilio di sali di tetrazolio XTT, e lettura spettrofotometrica. I dati ottenuti sono stati analizzati mediante l'analisi fattoriale della varianza.

Nelle condizioni sperimentali utilizzate il ceppo ST5 ha prodotto una quantità di biofilm equivalente in TSB e in RPMI rispetto al ceppo ST1 che ha prodotto più biofilm in TSB. I due ceppi di lievito hanno prodotto più biofilm in TSB, e *C. parapsilosis* più di *C. albicans*.

Mettendo a confronto *C. albicans* e *C. parapsilosis*, utilizzando il ceppo ST5 nella sequenza batterio-lievito, sia con esposizione a un solo farmaco sia con esposizione ai due farmaci in successione diversa, non si osserva differenza significativa tra i ceppi ma solo tra i farmaci. Il medesimo risultato si è ottenuto con il ceppo ST1.

La quantità finale del biofilm a partire dai lieviti risulta condizionata sia dalla sequenza dei farmaci utilizzata, gentamicina-caspofungina e viceversa, sia dal ceppo batterico aggiunto al lievito. La massima azione inibente è stata osservata con ST5 nella sequenza di applicazione caspofungina-gentamicina. Questo dato è confermato anche dai valori ottenuti facendo prima aderire ST5 e successivamente i lieviti.

## HELICOBACTER PYLORI E GENOTIPI DELLE CITOCHINE IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-10 IN PAZIENTI CON CARCINOMA GASTRICO.

Calà C.\*, Crivello A\*\*, Gullo A.\*\*\*, Bonura C.\*, Bica M.G.\*, Dato S.\*, Taormina S.\*, Giammanco A.\*

\* Dipartimento di Igiene e Microbiologia "G. D'Alessandro", Università degli Studi di Palermo

\*\* Dipartimento di Biologia e Metodiche Biomediche, Università degli Studi di Palermo

\*\*\* Istituto di Anatomia Patologica, Università degli Studi di Palermo

L'infezione da *Helicobacter pylori* è spesso associata a diversi quadri patologici, quali la gastrite cronica superficiale, l'ulcera peptica e duodenale, ed in particolare il persistere dello stato infiammatorio cronico, indotto dal microrganismo, rappresenta una condizione di rischio per l'insorgenza del carcinoma gastrico.

Ancor oggi sono in fase di studio e approfondimento i meccanismi molecolari innescati dal microrganismo nella sua espressione patogenetica, tuttavia è ormai accertato che l'insorgenza del quadro patologico è correlato, sia a fattori microbici quali VacA, CagA, adesine di superficie e l'enzima ureasi, sia alla risposta infiammatoria dell'ospite.

La persistenza della risposta infiammatoria indotta dall'infezione da *H. pylori*, è probabilmente uno dei fattori facilitanti la comparsa della trasformazione neoplastica a livello gastrointestinale. Come è noto il processo infiammatorio è regolato da un network di citochine pro ed anti-infiammatorie la cui produzione è influenzata da polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) o microsattellitari localizzati prevalentemente nelle regioni regolatrici o enhancer dei rispettivi geni in grado di influenzare i livelli di espressione delle stesse citochine e la severità del processo infiammatorio. Alcuni dei polimorfismi dell'interleuchina (IL)-1 $\beta$ , citochina proinfiammatoria, dell'IL-1Ra, suo antagonista naturale e dell'IL-10, potente citochina anti-infiammatoria, potrebbero avere un ruolo nel condizionare il decorso dell'infezione e la gravità della patologia gastrica.

Per verificare quest'ipotesi, 30 campioni biotipici di carcinoma gastrico, già inclusi in paraffina, sono stati, previa deparaffinizzazione ed estrazione del DNA, tipizzati per alcuni polimorfismi localizzati nel cluster genico dell'IL-1 e nel promotore dell'IL-10, con tecniche di PCR-SSP e PCR-FRLP. I genotipi sono stati quindi correlati con la presenza dell'infezione da *H. pylori* e con i caratteri delle neoplasie.

## HIV GENOME AND LONG TERM NON PROGRESSOR

Calugi G, Ciotti M, Benedetto A, D'Agostini C, Grelli S, Favalli C.

Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Policlinico Tor Vergata, Viale Oxford, 81-00133, Roma, Italy.

Five to ten percent of human immunodeficiency virus type 1 infected individuals remain asymptomatic without antiretroviral therapy for more than ten years and present stable levels of CD4+ cells (> 500 per mm<sup>3</sup>). These individuals are termed long term non progressor.

Sequencing studies on HIV1 genome isolated from PBMCs of these subjects have shown defects in *nef*, *vpr*, *vif*, *vpu* and *env* genes, suggesting that they could be infected by attenuated viruses.

We describe a case of a long term non progressor who has been infected in 1990, and since then he presents stable CD4+ cell counts (~ 800-1000 cells/mm<sup>3</sup>) and stable viral load (300-500 copies/ml). The aim of our study was to analyse by sequencing the entire proviral HIV1 genome to find out whether gene defects could account for the stable clinical picture of this patient. Clonal analysis revealed gross deletions in *nef* gene and in U3 region of LTRs with a conserved TAR sequence, while sequencing of the remaining genome regions (*gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* and *env*) showed conserved sequences.

It is known that *nef* gene may induce down regulation of CD4 and HLA class I and II molecules from the surface of HIV infected cells which represent an important escape mechanism for the virus to evade an attack mediated by cytotoxic CD8+ T cells and to avoid recognition by CD4+ T cells.

Based on this mechanism we can hypothesize that the gross defects found in *nef* gene of our patient could favor the cytotoxic CD8+ T cells response and slower disease progression. However, further studies are needed to confirm these hypothesis.

## CARATTERIZZAZIONE DI UN ISOLATO MARINO DI HELICOBACTER PYLORI

Luigina Cellini<sup>1</sup>, Rossella Grande<sup>1</sup>, Emanuela Di Campi<sup>1</sup>, Francesca Scroccarello<sup>1</sup>, Valentina Leonardi<sup>1</sup>, Tonino Traini<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche - Facoltà di Farmacia - Università "G. d'Annunzio" - Chieti

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche - Università "G. d'Annunzio" - Chieti

In questo studio riportiamo la caratterizzazione morfologica e genotipica di un ceppo di *Helicobacter pylori* isolato da campioni di acqua di mare e associato allo zooplancton. L'isolamento del batterio, è stato effettuato attraverso metodiche colturali standard. L'identificazione del putativo ceppo ambientale di *H.pylori* MDC1 è stata ottenuta attraverso tecniche biochimiche e biomolecolari. In particolare, la ricerca del gene *vacA* ed il suo sequenziamento, hanno permesso l'identificazione del ceppo, mentre la presenza dei principali fattori di virulenza di *H.pylori*, codificati dai geni *vacA m/s*, *cagA*, *babA* e *babB*, ha permesso la sua caratterizzazione genotipica. Inoltre, si è valutata la capacità dello stipite ambientale *H.pylori* MDC1 di formare Biofilm in vitro, su una superficie di polistirene in comparazione con due ceppi clinici ed il ceppo di riferimento internazionale *H.pylori* ATCC43629.

L'analisi dei principali marker di virulenza ha permesso di caratterizzare il ceppo di isolamento ambientale *H.pylori* MDC1, come *vacA s1m1*, *cagA+*, *babB*. In particolare, la presenza della variante allelica *vacA s1m1* e il gene *cagA+*, associati alle patologie gastroduodenali più severe, hanno consentito di classificare il ceppo come un potenziale patogeno.

Lo studio della formazione di Biofilm da parte di *H.pylori* MDC1, ha evidenziato la massima presenza di cluster con prevalenza del morfotipo coccoide dopo 48h d'incubazione presentando un comportamento sovrapponibile a quello degli altri stipiti esaminati. L'analisi nel tempo ha messo in evidenza nel ceppo di isolamento ambientale una maggiore capacità di conservare il fenotipo aggregato con la presenza di abbondante matrice.

Dai dati raccolti in questo studio si può concludere che, lo stipite *H.pylori* MDC1, isolato dallo zooplancton in ambiente marino, è caratterizzato da marker di virulenza identificati in ceppi presenti in casi di gravi patologie gastriche. Inoltre, il microorganismo è capace di adattarsi alle diverse condizioni di stress ambientale anche attraverso la formazione del Biofilm favorendo la trasmissione e garantendo la sopravvivenza della specie.

## ALTERAZIONE DELLE DIFESE MONOCITO-MEDIATE NEI CONFRONTI DI MICETI IN PRESENZA DI VIRUS ERPETICI

Claudio Cermelli, Valeria Cenacchi, Francesco Pezzini, Samuele Peppoloni, Rachele Neglia, Elisabetta Blasi

Dipartimento di Scienze Igienistiche, Microbiologiche e Biostatistiche

Università di Modena e Reggio Emilia

**Introduzione:** I casi clinici di infezioni miste sono in aumento, specialmente in ospiti immunocompromessi, ma gli eventi biomolecolari che caratterizzano la patogenesi delle malattie polimicrobiche sono ancora scarsamente conosciuti. Allo scopo di valutare le alterazioni funzionali del macrofago esposto alla doppia infezione, abbiamo messo a punto dei modelli in vitro di infezione mista da miceti (*Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*) e virus (herpesvirus umano 6 [HHV-6] e herpes simplex di tipo 1 [HSV-1]), germi neurotropi e causa di gravi patologie a livello del sistema nervoso centrale nel paziente immunocompromesso.

**Materiali e Metodi:** Cellule monocitiche THP-1 sono state esposte ad HHV-6 variante A (U1102), attraverso la co-cultura con cellule linfocitarie (linea JJHAN) infettate produttivamente (THP-1/JJHAN<sup>HHV-6</sup>) o con cellule di controllo (THP-1/JJHAN<sup>MOCK</sup>) per tempi diversi; successivamente, le co-culture sono state esposte a *C. neoformans* (isolato clinico ottenuto dal liquor di un paziente con meningite) e quindi saggiate per risposta secretoria (test ELISA) ed attività antimicrobica mediante valutazione della fagocitosi (allestimento di citopreparati opportunamente colorati) e dell'attività anticriptococcica (test di inibizione delle unità formanti colonia). Nel caso di HSV-1, le cellule THP-1 sono invece state infettate direttamente con inoculi da supernatanti di cellule infettate. Le cellule infettate col virus sono state poi esposte a *C. neoformans* o *C. albicans* e successivamente la funzionalità macrofagica è stata valutata come descritto sopra.

**Risultati:** Rispetto ai controlli THP-1/JJHAN<sup>MOCK</sup>, le co-culture THP-1/JJHAN<sup>HHV-6</sup> mostrano

a) significativa produzione di IL-12 e IFN- $\alpha$  che aumenta ulteriormente dopo infezione con *C. neoformans*; b) aumentata fagocitosi nei riguardi *C. neoformans*; c) scarsa ed invariata attività di killing a tempi brevi e d) ridotta capacità di contenere la crescita fungina a tempi successivi. Analogamente, THP-1 infettate con HSV-1 mostrano un'alterazione della loro risposta ai miceti.

**Conclusioni:** La presenza di herpesvirus altera la funzionalità macrofagica a vantaggio di miceti facilitandone la localizzazione intracellulare e promuovendone la replicazione. (Fondi PRIN-2003).

## **POLIMORFISMO AL CODONE 72 DELLA P53 E LESIONI CERVICALI ASSOCIATE AD INFEZIONI HPV ALTO RISCHIO**

<sup>1</sup>Coletti Anna, <sup>1</sup>Giuliani Laura, <sup>2</sup>Cappiello Tina, <sup>1</sup>Calugi Graziella, <sup>1</sup>Ciotti Marco e <sup>1</sup>Favalli Cartesio.

<sup>1</sup>Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Azienda Policlinico Universitario Tor Vergata, Viale Oxford 81-00133 Roma.

<sup>2</sup>Servizio di Microbiologia, Immunologia, Virologia; Ospedale S. Pertini, Via dei Monti Tiburtini 385-00157 Roma.

E' ormai accertato il ruolo eziologico del virus del papilloma umano, HPV, nel cancro della cervice uterina

Studi sull'oncosoppressore p53 in donne con infezioni cervicali da HPV hanno evidenziato che pazienti omozigote per l'aminoacido arginina al codone 72 hanno un rischio di sviluppare il cancro cervicale sette volte maggiore rispetto a quelle che contengono prolina (Storey et al, 1998).

Questi dati, sono stati confermati successivamente anche da altri studi (Dokianakis and Spandidos, 2000; Arbel-Alon et al, 2002).

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di investigare se e quanto, la presenza di arginina nella posizione 72 di p53, in 50 donne italiane con infezioni da HPV 16, 18, 31 (HPV alto rischio) e con alterazioni citologiche di basso grado, possa rappresentare un potenziale fattore di rischio tumorigenico, favorendo quindi la progressione della lesione cervicale in senso neoplastico.

Come gruppo di controllo sono state utilizzate altrettante donne HPV-negative e con pap-test negativo.

Entrambi i gruppi sono stati costituiti unicamente da donne italiane, in quanto, studi precedenti, hanno dimostrato sostanziali differenze legate al gruppo etnico di appartenenza (Arbel-Alon et al, 2002, Pegoraro et al, 2002).

I genotipi di p53 Arg72Pro sono stati determinati tramite amplificazione della regione di p53 sede del polimorfismo e successiva digestione del prodotto di PCR utilizzando l'enzima di restrizione BstUI.

La successiva riconferma dei dati mediante sequenziamento e l'analisi statistica degli stessi, hanno permesso di individuare le percentuali di omo- ed eterozigosi presenti nei campioni analizzati.

I dati raccolti durante tale studio confermano la presenza di più alte percentuali di omozigosi per l'aminoacido arginina nelle pazienti HPV positive rispetto alle pazienti negative di controllo.

Un costante monitoraggio delle lesioni citologiche e dell'infezione da HPV delle stesse pazienti potrà permettere la conferma o meno delle ipotesi suggerite in questo lavoro.

## **IL FATTORE CITOTOSSICO NECROTIZZANTE 1 DI ESCHERICHIA COLI BLOCCA IL CICLO CELLULARE IN FASE G2/M IN CELLULE UROEPITELIALI IN CULTURA**

Loredana Falzano<sup>1</sup>, Perla Filippini<sup>2</sup>, Sara Travaglione<sup>1</sup>, Alessandro Giamboi Miraglia<sup>1</sup>, Alessia Fabbri<sup>1</sup> and Carla Fiorentini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento del Farmaco e <sup>2</sup>Dipartimento di Tecnologia e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 – 00161 Roma

Negli ultimi anni sono state identificate numerose tossine batteriche capaci di modulare il ciclo cellulare dell'ospite (1). In questo contesto, gli studi da noi condotti suggeriscono che una tossina proteica, chiamata fattore citotossico necrotizzante 1 (CNF1) isolata da ceppi uropatogeni di *Escherichia coli*, è capace di controllare la progressione del ciclo cellulare nella linea uroepiteliale T24. Come è noto, il CNF1 attiva permanentemente le piccole GTPasi monomeriche della famiglia Rho (2), proteine coinvolte sia nella organizzazione dell'actina citoscheletrica che nella regolazione di numerose funzioni cellulari, tra cui la proliferazione e il controllo del ciclo cellulare (3). Gli studi da noi condotti hanno evidenziato che il trattamento con il CNF1 induce nelle T24 un accumulo delle cellule nella fase G<sub>2</sub>/M del ciclo cellulare. Questa attività anti-proliferativa della tossina è associata al sequestro nel citoplasma della ciclina B1 e a una marcata riduzione dell'espressione di questa proteina. Va sottolineato, inoltre, che il CNF1, pur bloccando le T24 in fase G<sub>2</sub>/M, non induce morte cellulare per apoptosi nelle cellule trattate.

In conclusione, i risultati da noi ottenuti ci permettono di includere il CNF1 nella lista delle cosiddette "ciclomoduline", ossia di quelle tossine capaci di modulare il ciclo cellulare. In questo scenario, è possibile ipotizzare che il CNF1, bloccando il ciclo cellulare senza "condannare" a morte le cellule, possa rappresentare un rischio per la trasformazione neoplastica nei tessuti uroepiteliai infettati da *E. coli*. Questa ipotesi è in accordo con diversi studi condotti su modelli sperimentali *in vivo* che indicano come i ceppi di *E. coli* uropatogeni rappresentino un fattore di rischio nello sviluppo del cancro nella vescica (4).

## INTERAZIONE SINERGICA TRA COTRIMOSSAZOLO E MACROLIDI A 16 ATOMI NEGLI STREPTOCOCCI.

Roberto Bandettini (1), Simona Roveta (2), Eugenio A. Debbia (2).

(1) Istituto G. Gaslini, Largo G. Gaslini 5, 16147 Genova.

(2) Università di Genova, DISCAT – Sezione di Microbiologia, Largo R. Benzi 10, 16132 Genova.

**Introduzione:** In alcuni antibiogrammi relativi a ceppi di *S. pyogenes* e *S. pneumoniae* (eseguiti con la metodica classica Kirby-Bauer) sono stati osservati degli aloni di inibizione riconducibili ad un possibile effetto di interazione sinergica tra cotrimossazolo (SXT) e macrolidi a 16 atomi.

**Materiali e Metodi:** In seguito a questo riscontro sono stati analizzati 104 ceppi di *S. pyogenes* e 72 ceppi di *S. pneumoniae* di recente isolamento appartenenti alla collezione dell'Istituto di Microbiologia del DISCAT. Su ogni stipite è stato eseguito l'antibiogramma (Kirby-Bauer) per SXT, un macrolide a 15 atomi e un macrolide 16 atomi. Il dischetto di SXT è stato posto alla distanza di 2 cm dai dischetti dei macrolidi per evidenziare l'eventuale sinergismo.

**Risultati:** Sui ceppi di *S. pyogenes* è stata osservata un'interazione positiva nel 93.3% dei casi. Solamente 7 ceppi hanno mostrato assenza di sinergismo; 4 di questi erano SXT-S, 3 SXT-R, tutti erano resistenti ad entrambi i macrolidi (15 e 16 atomi). Per quanto riguarda *S. pneumoniae*, il sinergismo SXT-macrolide a 16 atomi è stato riscontrato nel 51.4% dei ceppi analizzati. Negli stipiti SXT-S questa percentuale saliva al 65%, mentre in quelli SXT-R era solamente del 46.2%. Nei ceppi in cui non è stato evidenziato sinergismo la resistenza ai macrolidi non era sostanzialmente differente da quelli in cui si era invece osservato sinergismo.

**Conclusioni:** Il sinergismo SXT-macrolide a 16 atomi osservato in piastra tramite gli aloni di inibizione dei dischetti di antibiotico sembra essere più significativo per i ceppi di *S. pyogenes* piuttosto che per i ceppi di *S. pneumoniae*. In *S. pyogenes* l'interazione positiva appare più influenzata dalla sensibilità dello stipite ai macrolidi che a SXT. In *S. pneumoniae*, invece, il sinergismo sembra essere indipendente dalla sensibilità del ceppo ai macrolidi, mentre appare più influenzato dalla sensibilità a SXT. Ulteriori indagini sono in corso per valutare la natura dell'interazione tra queste molecole osservata su piastra.

## IPERMUTAZIONE E RICOMBINAZIONE IN CEPPI INVASIVI DI *N. MENINGITIDIS*

R. Colicchio,<sup>1</sup> C. Pagliarulo,<sup>1</sup> F. Lamberti,<sup>1</sup> C. B. Bruni,<sup>1</sup> P. Alifano<sup>3</sup> e P. Salvatore.<sup>1,2</sup>

1) Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano", Università degli Studi di Napoli "Federico II", ed Istituto di Endocrinologia ed Oncologia Sperimentale "G. Salvatore" del C.N.R.

2) Facoltà di Scienze Biotecnologiche, Università degli Studi di Napoli "Federico II".

3) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche e Ambientali, Università degli Studi di Lecce.

*Neisseria meningitidis* ha evoluto sofisticati meccanismi che gli consentono di adattarsi al variare delle condizioni ambientali riscontrate nell'ospite. Meccanismi molecolari che giocano un ruolo importante nell'evoluzione del fenotipo patogeno di tale microorganismo sono rappresentati dalla variazione di fase e dalla variazione antigenica, il cui studio risulta fondamentale per la comprensione dell'ipermutazione.

Ceppi invasivi di *N. meningitidis* di sierogruppo B, filogeneticamente correlati alla linea iper-virulenta lineage III (ET-24), mostrano un fenotipo mutatore determinato mediante analisi di fluttuazione, utilizzando la rifampicina come marcatore selettivo di resistenza.

L'ipermutazione è associata alla presenza di alleli a mosaico del gene *mutL* caratterizzati dalla presenza di numerose mutazioni missenso che, in gran parte, coincidono con mutazioni precedentemente identificate in altri ceppi mutatori. Il numero delle mutazioni missenso sembra essere correlato con la forza del fenotipo mutatore. I nostri studi hanno consentito di dimostrare che il fenotipo mutatore è soppresso quando l'allele *recB*<sup>ET-37</sup> non funzionale, derivato dai ceppi di meningococco di linea ET-37, sostituisce l'allele *recB* funzionale in un ceppo di lineage III caratterizzato da difetti nel sistema del mismatch repair. La stessa sostituzione allelica non influenza, invece, le frequenze di mutazione in un ceppo di linea ET-5 privo di difetti del mismatch repair system. Tali risultati ci spingono ad ipotizzare che la mutabilità spontanea, *in vitro*, dei ceppi di *N. meningitidis* di lineage III dipende da difetti biochimici del pathway di riparazione degli appaiamenti errati, in particolare da alterazioni della proteina MutL, ed aumenta durante la sintesi post-replicativa del DNA associata all'attività del pathway RecBCD.

## CRESCITA IN GEL DI COLLAGENE: UN MODELLO PER VALUTARE LA SENSIBILITÀ DI *CANDIDA ALBICANS* AGLI ANTIMICOTICI.

S. Cagnacci, F. Cavallini, D. Medicina<sup>1</sup>, E.A. Debbia, R. Corvò<sup>2</sup>, L. Rossi  
Istituto di Microbiologia- Università di Genova

<sup>1</sup>Spedali Civili di Brescia,<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Oncologiche-S.C. Radioterapia San Remo

**Scopo.** L'efficacia dei farmaci antimicotici viene valutata con gli usuali saggi di sensibilità. Tuttavia, questi sono condotti in un contesto altamente selettivo in quanto le Candide sono isolate, mentre in vivo sono sempre a contatto con i tessuti dell'ospite. Per questo è stato elaborato un modello sperimentale in cui le Candide vengono co-coltivate con popolazioni cellulari epiteliali e mesenchimali.

**Materiali e metodi.** Il modello base è la crescita cellulare in gel di collagene I. Le Candide (*Candida albicans*) sono state isolate da un paziente immunocompromesso. Le linee cellulari umane usate sono state HSCO (carcinoma squamoso orofaringeo), KB-22 (carcinoma squamoso gengivale), HSF (fibroblasti dermali normali) e HECV (cellule endoteliali normali). Le candide usate sono sensibili all'Amfotericina B (AmB, MIC 0.5) e resistenti al Ketoconazolo (Kc, MIC 2). Il numero delle particelle sopravvissute ai vari trattamenti è stato calcolato utilizzando il test di esclusione del tripan-blu.

**Risultati.** Le cellule epiteliali HSCO e KB-22 favoriscono la proliferazione delle Candide e le cellule HECV ne inibiscono la crescita (nei due casi  $p < 0.0001$ ), mentre in presenza delle cellule HSF la proliferazione del microorganismo è rimasta comparabile al controllo. Il trattamento con 10 µg/ml di AmB ha indotto l'inibizione della crescita delle Candide da sole ( $p < 0.0001$ ). Nelle co-culture la risposta è stata più diversificata rispetto ai controlli. La sensibilità delle candide è aumentata in presenza delle cellule HECV e HSF, è rimasta invariata con le cellule KB-22 ed è diminuita con le cellule HSCO. Come atteso le Candide hanno dimostrato una resistenza quasi totale a 10 µg/ml di Kc, sia coltivate da sole che in presenza delle cellule HSF, HECV e KB-22, mentre vi è stato un leggero aumento di sensibilità in presenza delle cellule HSCO.

**Conclusioni.** Anche se le candide usate nel presente studio sono costitutivamente sensibili all'AmB, la presenza delle cellule umane si è rivelata sufficiente a modulare questa sensibilità. Pertanto i risultati suggeriscono di adottare le co-culture in gel di collagene come modelli complementari ai test MIC per valutare l'efficacia dei farmaci antimicotici. (Ricerca condotta con il supporto della Pfizer Italia).

## ATTIVITÀ ANTIVIRALE DELL'OLIO DI *MELALEUCA ALTERNIFOLIA*

R. Timpanaro<sup>1</sup>, A. Garozzo<sup>1</sup>, G. Bisignano<sup>2</sup>, G. Mandalari<sup>2</sup>, P.M. Furneri, A. Stivala<sup>1</sup>, A. Castro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche, Università di Catania

<sup>2</sup> Dipartimento Farmaco-biologico, Università di Messina

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 dell'olio di *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil), una pianta della famiglia delle Myrtaceae presente solamente in alcune zone dell'Australia e nota fin dai tempi più antichi per le sue proprietà antisettiche.

Il *Tea tree oil* contiene ben 48 composti organici, che consistono principalmente in monoterpeni ossigenati e non ossigenati, sesquiterpeni e alcoli triterpenici. La diversa concentrazione degli elementi chimici presenti può influenzare l'attività antimicrobica. La nostra ricerca si è basata sullo studio dell'attività anti herpes simplex 1 e 2 dell'olio di *Melaleuca alternifolia* e dei suoi principali componenti.

In una prima fase, abbiamo eseguito l'analisi qualitativa e quantitativa del *Tea tree oil* mediante gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC/MS) e gascromatografia con rivelazione a ionizzazione di fiamma GC(FID), al fine di evidenziarne i principali costituenti. I risultati hanno dimostrato un'alta quantità di terpinene-4-ol (36,71%) e g-terpinene (22,20%), e un moderato livello di 1,8 cineolo (2,49%), p-cimene (2,52%), a-terpinene (10,10%) e terpinolene (3,53%).

Nella fase successiva è stata studiata l'attività antivirale *in vitro* dell'olio essenziale di *Melaleuca alternifolia* e di alcuni suoi costituenti nei confronti dei virus Herpes simplex tipo 1 e 2.

Gli esperimenti di aggiunta delle sostanze durante il ciclo replicativo dei due virus erpetici non hanno dimostrato attività inibente. Abbiamo quindi condotto esperimenti di virucidia allo scopo di evidenziarne un eventuale azione diretta sul virus. I risultati hanno dimostrato per tutti i composti una attività virucida dose-dipendente sia nei confronti dell'HSV-1 che dell'HSV-2. In particolare, la migliore attività virucida è stata osservata per i composti terpinolene, g-terpinene ed a-terpinene.

L'olio di *Melaleuca* ha ridotto del 100% il titolo dei due virus in esame fino a concentrazioni di 0,125%. L'effetto neutralizzante si evidenziava già dopo 15 minuti d'incubazione a 37 °C e raggiungeva la massima attività dopo un'ora d'incubazione.

## IL DOMINIO DELLA PROTEINA PSpC CHE LEGA IL FATTORE H DEL COMPLEMENTO CONFERISCE IMMUNITÀ PROTETTIVA VERSO LA SEPSI DA *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* NEL TOPO

Susanna Ricci<sup>1</sup>, Robert Janulczyk<sup>2</sup>, Velia Braione<sup>1</sup>, Lars Bjorck<sup>2</sup> e Gianni Pozzi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> LA.M.M.B., Dipartimento di Biologia Molecolare, Università di Siena, Italia.

<sup>2</sup> Sezione di Medicina Infettiva Clinica e Sperimentale, Dipartimento di Biologia Molecolare e Cellulare, Università di Lund, Svezia.

Una possibile alternativa all'uso di vaccini polisaccaridici o coniugati contro le infezioni da parte dello *Streptococcus pneumoniae* consiste nello sviluppo di efficaci vaccini su base proteica costituiti da antigeni comuni ai vari sierotipi capsulari dello pneumococco. Nel presente lavoro è stata valutata la capacità del dominio della proteina PspC che lega il fattore H del complemento (PspC<sub>39-261</sub>) di indurre immunità cross-protettiva verso la sepsi causata da sierotipi diversi dello *S. pneumoniae*. A tale proposito, è stato utilizzato un modello di sepsi nel topo messo a punto nel nostro laboratorio. Topi CBA/Jico sono stati immunizzati con il frammento PspC<sub>39-261</sub> (purificato dal ceppo di tipo 3 HB565) e poi infettati con il ceppo omologo HB565 e con i ceppi eterologhi D39 (tipo 2) e TIGR4 (tipo 4). Il dominio PspC<sub>39-261</sub> ha indotto titoli elevati di IgG sieriche antigene-specifiche in tutti i topi immunizzati. Nei topi infettati con il ceppo HB565 alle dosi di 10<sup>6</sup> e 10<sup>7</sup> unità formanti colonia (UFC) sono state osservate differenze significative ( $P < 0,05$ ) nei tempi di morte e nella sopravvivenza tra gli animali vaccinati con PspC<sub>39-261</sub> e quelli di controllo e, la dose letale per il 50% degli animali (DL<sub>50</sub>) era 70 volte superiore negli animali immunizzati rispetto ai controlli. Al contrario, non è stata rinvenuta alcuna differenza tra animali vaccinati e controlli né nei tempi di morte né nella sopravvivenza quando il *challenge* è stato effettuato con il ceppo TIGR4. Nel caso del ceppo D39, sebbene la sopravvivenza sia risultata la stessa nei topi vaccinati e nei controlli, è stato osservato un prolungamento significativo ( $P < 0,05$ ) dei tempi di morte negli animali immunizzati con PspC<sub>39-261</sub> rispetto ai controlli. Questi risultati dimostrano che PspC<sub>39-261</sub> induce un'immunità protettiva verso l'infezione con il ceppo omologo HB565 e prolunga la sopravvivenza dei topi infettati con il ceppo eterologo D39.

## VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ MICROBICA E DELLA PRESENZA DI PATOGENI IN SUOLI AMMENDATI CON COMPOST

Leone A.<sup>1</sup>, Iovieno P.<sup>1</sup>, Donnarumma G.<sup>2</sup>, Tufano M.A.<sup>2</sup>, Alfani A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Chimica - Università di Salerno -

<sup>2</sup>Dip. di Medicina Sperimentale, Sez. Microbiologia, Seconda Università di Napoli

e-mail: [aleone@unina.it](mailto:aleone@unina.it)

I microrganismi svolgono un ruolo fondamentale nel ciclo della materia influenzando la fertilità biologica del suolo. Essi utilizzano la sostanza organica come fonte di energia e di nutrienti. Poiché i suoli agrari dell'area mediterranea sono caratterizzati da uno scarso contenuto di sostanza organica, l'utilizzo agronomico del compost come ammendante sta assumendo sempre maggiore importanza, anche perché rappresenta una strategia di recupero e valorizzazione della frazione organica dei rifiuti. La qualità dei rifiuti organici e l'efficienza dei processi utilizzati per la produzione del compost sono di fondamentale importanza per evitare l'apporto al terreno di materiali indesiderati e l'insorgenza di problemi igienico-sanitari.

Presso due istituti sperimentali del CRA (Consiglio per la Sperimentazione e la Ricerca in Agricoltura) situati a Battipaglia e a Pontecagnano, nell'ambito di un progetto triennale finanziato dalla Regione Campania è in corso una ricerca che mira a valutare gli effetti del compost sull'attività microbica del suolo, nonché una eventuale contaminazione da patogeni. Per ognuna delle due stazioni sperimentali sono stati allestiti i seguenti trattamenti replicati su tre parcelle: nessun trattamento (CNT); fertilizzazione annuale con 15, 30, 45 t ha<sup>-1</sup> di compost (C15, C30, C45) e fertilizzazione minerale (MIN) secondo le modalità convenzionali previste per le colture in avvicendamento. L'attività microbica di questi suoli è stata valutata monitorando la respirazione basale e alcune attività enzimatiche: l'attività fosfatasi, l'attività idrolasica totale, l'attività arilsolfatasi e l'attività b-glucosidasi che sono considerate indicatori precoci dell'attività biologica del suolo.

I dati relativi al secondo anno del progetto, presentati in questa nota, mostrano un incremento del metabolismo microbico del suolo per effetto delle aggiunte di compost. L'incremento è particolarmente evidente nella stazione di Battipaglia dove il contenuto di sostanza organica del suolo, più basso rispetto a quello di Pontecagnano, rappresenta evidentemente una forte limitazione per la comunità microbica. Le salmonelle sono risultate assenti sia nelle parcelle controllo che in quelle ammendate con compost. Gli streptococchi fecali e i coliformi fecali sono presenti con una più elevata concentrazione nelle parcelle trattate col compost.

## EFFETTO DI CAMPI ELETTROMAGNETICI A FREQUENZA ESTREMAMENTE BASSA SU CELLULE PROCARIOTICHE

Luigina Cellini<sup>1</sup>, Rossella Grande<sup>1</sup>, Emanuela Di Campli<sup>1</sup>, Soraya Di Bartolomeo<sup>1</sup>, Rita Marra<sup>1</sup>, Iole Robuffo<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche - Facoltà di Farmacia - Università "G. d'Annunzio" - Chieti

<sup>2</sup>Istituto per i Trapianti d'Organo e l'Immunocitologia - CNR - Chieti

I campi elettromagnetici sono onde magnetiche ed elettriche che viaggiano alla velocità della luce. Numerosi studi sperimentali hanno valutato i loro potenziali effetti sulla salute con risultati controversi. Gli effetti dei campi elettromagnetici a frequenza estremamente bassa (ELF) sono stati saggiati su diversi sistemi biologici sia eucariotici che procariotici. In particolare, il modello cellulare procariotico risulta particolarmente versatile consentendo una rapida evidenza degli esiti acuti e cronici prodotti.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare se e come i microrganismi procariotici sono capaci di attivare strategie di adattamento per superare lo stress indotto dall'esposizione a ELF.

Per gli esperimenti è stato usato il ceppo di riferimento *Escherichia coli* ATCC 700926.

Il campo elettromagnetico è stato generato all'interno di un solenoide cilindrico verticale, alimentato da un trasformatore. I parametri usati per gli esperimenti sono stati: 50Hz di frequenza e un campo magnetico di 1mT nell'area centrale interna del solenoide.

Per ogni brodocoltura esposta a ELF e per i rispettivi controlli sono stati valutati: i) la conta totale monitorata con biofotometro a 600nm (OD<sub>600</sub>), ii) il test di vitalità con Live/Dead Kit, iii) l'aspetto morfologico con microscopia ottica ed elettronica a trasmissione, iv) il DNA fingerprinting con tecnica di AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

Le brodoculture esposte hanno mostrato, nel tempo, un incremento delle cellule vitali rispetto alle cellule di controllo.

Per quanto riguarda gli aspetti morfologici, l'esposizione a ELF ha prodotto un significativo cambiamento del morfotipo di *E. coli* con presenza di cellule coccoidi. Inoltre, sono state osservate forme batteriche atipiche allungate suggerendo una probabile alterazione durante la divisione cellulare.

L'analisi dei DNA fingerprinting tra i campioni esposti ed i rispettivi controlli non ha mostrato significative variazioni nei pattern genotipici.

I risultati di questo studio indicano che gli ELF possono agire sui batteri come fattori di stress, inducendo cambiamenti nella popolazione cellulare. Pertanto, i batteri possono rappresentare un modello versatile per studiare effetti acuti e cronici correlati

## GLICOPROTEINE gB e gH di HSV-1: RUOLO DELLE HEPTAD REPEATS

Stefania Galdiero<sup>2,3</sup>, Mariateresa Vitiello<sup>1,3</sup>, Annarita Falanga<sup>1</sup>, Marina D'Isanto<sup>1</sup>, Craig Collins<sup>4</sup>, Katia Raieta<sup>1</sup>, Carlo Pedone<sup>2,3</sup>, Helena Browne<sup>4</sup>, Massimiliano Galdiero<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Experimental Medicine - II University of Naples, Italy; <sup>2</sup>Department of Biological Science & <sup>3</sup>CIRPEB - University of Naples "Federico II", Italy; <sup>4</sup>Division of Virology, Department of Pathology - University of Cambridge, UK.

L'*envelope* dell'Herpes simplex virus 1 (HSV-1) contiene numerose proteine, molte delle quali glicosilate, coinvolte nelle prime fasi dell'infezione virale, quali l'adesione e la penetrazione delle particelle virali nella cellula ospite. Tra le glicoproteine, gB, gD, gH e gL sono necessarie e sufficienti per la penetrazione virale. La glicoproteina gH, conservata in tutti i membri della famiglia degli herpes virus, è caratterizzata dalla presenza di un peptide interno di fusione e due regioni elicoidali (4,3 *heptad repeat*) indicate come HR1 e HR2. La presenza di regioni *heptad repeat* (HR) è stata evidenziata nelle proteine di fusione di diversi virus della classe I, rappresentando un'importante caratteristica di questi virus. Mediante l'uso di algoritmi sono stati individuati potenziali domini ad *heptad repeat* in gH e gB; in particolare, sono state identificate due regioni HR nella glicoproteina gH e due regioni HR in gB. Sono stati sintetizzati una serie di peptidi corrispondenti ai possibili *heptad repeats* e gli esperimenti effettuati dimostrano che i peptidi sintetizzati inibiscono, in maniera dose-dipendente, la penetrazione virale. In particolare, delle due regioni analizzate per la glicoproteina gH, solo quella con maggiore propensione a formare *heptad repeats* riduce significativamente l'infettività virale. Mediante tecniche biofisiche abbiamo inoltre valutato le possibili interazioni tra i peptidi sintetici corrispondenti agli HR della stessa glicoproteina oppure delle due diverse glicoproteine. I risultati ottenuti suggeriscono un'interazione tra l'HR N-terminale e l'HR C-terminale di gH.

Questo lavoro è stato finanziato dalla Comunità Europea contratto n. QLK2-CT-2002-00810

## CONSERVAZIONE E DIVERSITÀ DEI DOMINI DI LEGAME DELLE ADESINE HMW1 E HMW2 IN ISOLATI DI *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* NON TIPIZZABILE.

Maria Giufre<sup>1</sup>, Michele Muscillo<sup>2</sup>, Rita Cardines<sup>1</sup>, Paola Mastrantonio<sup>1</sup>, Marina Cerquetti<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate e <sup>2</sup>Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

L'adesione di *Haemophilus influenzae* non tipizzabile (NTHi) alla mucosa delle alte vie respiratorie rappresenta il primo stadio nella patogenesi delle infezioni sostenute da questo microrganismo. Le adesine HMW1 e HMW2 sono espresse in circa lo 80% degli isolati clinici. Originariamente identificate nel ceppo NTHi 12, tali adesine sono codificate da due loci cromosomali distinti, *hmw1* e *hmw2*, ciascuno comprendente il gene strutturale *hmwA* e i geni accessori *hmwB* e *hmwC*. Nel ceppo 12, le proteine HMW1 e HMW2 presentano differente specificità di legame. I corrispondenti domini adesivi sono localizzati nella regione di massima divergenza tra le sequenze HMW1 e HMW2 (40% identità e 58% similarità).

Al fine di studiare la conservazione dei domini adesivi di HMW1 e HMW2 tra ceppi diversi, sono stati analizzati 9 isolati invasivi NTHi avvalendosi di tecniche di PCR e sequenziamento genico. Dapprima, i geni *hmw1A* e *hmw2A* sono stati amplificati separatamente mediante PCR giovandosi di sequenze specifiche presenti in geni fiancheggiati. Quindi, i prodotti PCR *hmw1A* e *hmw2A* sono stati utilizzati come template in PCR nested per ottenere amplificati comprendenti le sequenze dei due domini adesivi. Nell'ambito di ciascun dominio, è stata condotta un'approfondita analisi di sequenza utilizzando specifici programmi del pacchetto GCG. Nel complesso, l'analisi ha evidenziato notevoli differenze di sequenza tra ceppo e ceppo. Tuttavia, in entrambi i domini, i grafici di similarità generati dal programma PLOT SIMILARITY hanno mostrato un pattern peculiare: picchi ad elevata similarità (fino al 90%) si alternavano a regioni decisamente divergenti (10-20%). L'albero filogenetico costruito sulle sequenze amminoacidiche dedotte ne ha evidenziato la segregazione in due clusters distinti, uno HMW1-simile e l'altro HMW2-simile. L'analisi MEME ha identificato la presenza di specifici patterns di motivi conservati (ciascuno costituito da 8-20 amminoacidi) all'interno di ciascun gruppo di sequenze. In conclusione, questo studio dimostra che i domini adesivi delle proteine HMW1 e HMW2 di ceppi diversi, pur se caratterizzati da un'elevata eterogeneità di sequenza, presentano regioni costituite da motivi amminoacidici conservati. Si può ipotizzare che tali regioni svolgano un ruolo nel mantenimento delle differenti specificità di legame di HMW1 e HMW2.

## EFFETTI IMMUNOMODULATORI DI UN SET DI ANALOGHI DELL'AMIGDALINA SU CHERATINOCITI UMANI

Paoletti I, Greco R, Lanzieri N, Di Palma A, Fusco A, Tufano MA  
Dipartimento di Medicina Sperimentale-Sezione di Microbiologia  
Seconda Università degli Studi di Napoli

Il Peptide T (PT) è un octapeptide della regione V2 della proteina gp 120 di HIV-1. Dati bibliografici indicano che il PT ha attività antinfiammatoria e induce in cellule Th2 umane e in cellule mononucleate del sangue periferico la produzione di IL-10, potente citochina antinfiammatoria. Studi *in vivo* dimostrano che il PT è in grado di risolvere patologie infiammatorie cutanee come lesioni psoriasiche. Precedenti studi da noi eseguiti supportano il benefico effetto del PT e suggeriscono il ruolo chiave dei linfociti e dei cheratinociti: il PT agisce su cheratinociti direttamente stimolando la funzione antinfiammatoria, riducendo l'iperproliferazione cellulare e favorendo la rigenerazione dei tessuti.

Dal punto di vista farmacologico, i peptidi non sono buoni agenti terapeutici, poiché hanno un basso potere di assorbimento, sono facilmente metabolizzabili e sono immunogeni. Per questo motivo, usando modelli computerizzati, è stata identificata come peptidomimetico del PT l'amigdalina, un prodotto naturale. Poiché l'amigdalina possiede un profilo tossico dovuto alla presenza di un gruppo cianidrico, sono stati sintetizzati analoghi mancanti di tale gruppo e testati per la loro attività biologica. In particolare, in questo lavoro, usando come modello sperimentale cheratinociti umani, abbiamo analizzato gli effetti di tre peptidomimetici: SVT-03016, SVT-03017, SVT-03018, sull'espressione di HSP-70, TGF- $\beta$ ,  $\alpha$ v integrina, ICAM-1 e citochine, mediante analisi per western blot e saggi ELISA.

I nostri risultati evidenziano una espressione di HSP-70 TGF- $\beta$  e  $\alpha$ v integrina simile a quella ottenuta mediante stimolazione dei cheratinociti con PT. L'espressione del TNF- $\alpha$  è chiaramente differenziata. Infatti solo il PT e SVT-03018 inducono overespressione di questa citochina. SVT-03018 induce anche una più marcata up-regolazione dell'IL-10 rispetto al PT e gli altri due analoghi. Infine tutti e tre gli analoghi riducono come il PT l'espressione delle ICAM-1 e non modificano il rilascio delle interleuchine pro-infiammatorie. Si può quindi concludere che molecole che ben mimano l'effetto del PT possano rappresentare una alternativa nella strategia terapeutica della psoriasi.

## PROPRIETA' ADESIVE ED INVASIVE DI *LISTERIA IVANOVII* IN CARENZA DI FERRO E IN AMBIENTE ACIDO.

C. Longhi<sup>a</sup>, F. Biafora<sup>a</sup>, M.P. Conte<sup>a</sup>, S. Schippa<sup>a</sup>, M.G. Ammendolia<sup>b</sup>, F. Superti<sup>b</sup>, L. Seganti<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, Università di Roma La Sapienza ; <sup>b</sup>Dipartimento di Tecnologia e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

*Listeria ivanovii* e *Listeria monocytogenes* sono le due uniche specie patogene nell'ambito del genere *Listeria*. Sebbene questi parassiti intracellulari facoltativi possiedano analoghe caratteristiche di virulenza legate all'espressione di un simile cluster genico, essi differiscono nella patogenicità. Infatti *L. monocytogenes* è responsabile di gravi infezioni sia nell'uomo che negli animali mentre *L. ivanovii* è principalmente responsabile di infezioni nei ruminanti nei quali causa aborti e sepsi neonatali ed è raramente patogeno per l'uomo. Mentre *L. monocytogenes* è stata oggetto di numerosi studi sulla patogenicità e l'espressione di geni di virulenza in seguito all'esposizione a diversi stress ambientali, poco è noto a tale riguardo per *L. ivanovii*.

In questa ricerca sono state studiate la sopravvivenza, l'adesività, l'efficienza d'invasione e la moltiplicazione intracellulare di *L. ivanovii* in ambiente acido e in carenza di ferro. I risultati ottenuti hanno dimostrato che *L. ivanovii*, a differenza di *L. monocytogenes*, non sopravvive all'esposizione a pH letale, anche quando i batteri vengono pretrattati a pH debolmente acido, nonostante nel ceppo di riferimento da noi utilizzato sia presente il sistema genico *gad*. L'adesione e l'invasione, valutata in cellule intestinali Caco-2, come osservato in precedenza per *L. monocytogenes*, è risultata dipendere dalla concentrazione in ioni ferro, essendo più bassa quando i batteri venivano cresciuti in carenza di ferro. Al contrario, l'esposizione di *L. ivanovii* ad un doppio stress, rappresentato dal pH acido e dalla carenza di ferro, ha determinato una maggiore efficienza di invasione in cellule amniotiche Wish. I batteri sono stati anche osservati al microscopio elettronico che ne ha evidenziato una diversa aggregazione nelle varie condizioni sperimentali, risultando più aggregati in seguito all'esposizione al doppio stress. Questi risultati, qualora venissero confermati da analisi molecolari in corso sull'espressione dei principali geni correlati all'invasività e all'acido resistenza di *L. ivanovii*, farebbero supporre che l'associazione delle due condizioni di stress possa modulare l'esposizione di determinanti che favoriscono l'aggregazione e l'adesività dei batteri, con conseguente maggiore capacità di invasione e diffusione nelle cellule bersaglio dell'ospite.

## ANALISI DEL CONTENUTO MICROBICO NELL'ARIA DI ALLEVAMENTI BUFALINI IN CAMPANIA

Marina D'Isanto, Mariateresa Vitiello, Daniela Anastasi, Maria Rao, Massimiliano Galdiero, Marilena Galdiero

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sez. di Microbiologia e Microbiologia Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Seconda Università degli Studi di Napoli.

L'allevamento bufalino è peculiarmente diffuso in Italia meridionale. Un incremento di produttività negli allevamenti di bestiame è associato all'aumento del numero dei capi all'interno delle stalle. L'affollamento delle stalle comporta un accumulo nell'ambiente dei microrganismi, derivanti dal materiale fecale e dai mangimi, e dei loro prodotti. Una delle conseguenze immediate di tale accumulo è l'aumento dell'incidenza delle bronchiti croniche di tipo allergico nel personale addetto all'allevamento. Al momento attuale non sono disponibili molte informazioni sullo stato microbiologico dell'aria di un allevamento di bufali. Obiettivo del presente lavoro è stato determinare la composizione e la concentrazione della flora batterica e micotica presente nell'aria di vari allevamenti selezionati a tale scopo, siti nella provincia di Salerno ed in quella di Caserta.

I campioni d'aria sono stati raccolti con un campionatore tipo SAS (Surface Air System) utilizzando diversi terreni di coltura. Le piastre sono state incubate a 37°C per 24 h e a temperatura ambiente (23 +/- 3°C) fino a 14 giorni dalla prima esposizione.

La concentrazione dei batteri e dei miceti è stata calcolata per m<sup>3</sup> di aria, e i più comuni generi di batteri presenti sono stati identificati con metodi convenzionali. L'identificazione dei miceti è stata effettuata mediante analisi macroscopica e microscopica seguita da quella biochimica. I risultati ottenuti mostrano che la concentrazione media di batteri coltivabili è stata di 3 x 10<sup>5</sup> CFU/m<sup>3</sup>. La concentrazione media dei miceti coltivabili è stata di circa 1 x 10<sup>3</sup> CFU/m<sup>3</sup>. Tra i batteri gram-negativi identificati i generi identificati sono state: *Enterobacteriaceae* (circa 42 %), *Pseudomonadaceae* (circa 10.5 %) e *Neisseriaceae* (circa 45.6 %). Le specie batteriche appartenenti al genere *Enterobacteriaceae* isolate con maggiore frequenza sono state: *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans* e *Proteus spp*. Il genere predominante tra i miceti tipizzati era *Cladosporium*. Altri generi frequentemente identificati erano *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e lieviti. In conclusione, la presenza di elevate concentrazioni di microrganismi nei campioni d'aria prelevati, sia di batteri che di miceti suggerisce la necessità di applicare misure preventive più opportune nei confronti di tale problematica.

## LO STATO REDOX IN CELLULE INFETTATE DA CHLAMYDIA PNEUMONIAE

R. Sessa, M. Di Pietro, G. Schiavoni, B. Maras<sup>1</sup>, A. Macone<sup>1</sup>, C. Zagaglia, S. Faccilongo, A. Vitale, M. del Piano

Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica e <sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Biochimiche, Università degli Studi di Roma "La Sapienza"

L'associazione della *Chlamydia pneumoniae*, batterio patogeno intracellulare obbligato, con le malattie aterosclerotiche cardiovascolari ha destato negli ultimi anni l'interesse di molti ricercatori che hanno valutato i diversi aspetti immunologico e biochimico, coinvolti nella patogenesi dell'aterosclerosi.

I macrofagi, protagonisti del sistema di difesa immunitario, giocano un ruolo importante nel processo infiammatorio dell'aterosclerosi.

Studi in vitro hanno rilevato la capacità della *C. pneumoniae* di replicarsi nei monociti-macrofagi, cellule coinvolte nella formazione della placca aterosclerotica.

Nella patogenesi dell'infezione da *C. pneumoniae* è implicato lo stress ossidativo, cioè la relazione tra produzione di radicali liberi e il sistema di difesa antiossidante, costituito principalmente dal glutatone.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare lo stato redox nelle cellule epiteliali Hep-2 e nei monociti U937 in seguito ad infezione da *C. pneumoniae*.

E' stata determinata, in HPLC, la concentrazione della forma ridotta ed ossidata del glutatone (GSH, principale antiossidante) nelle cellule U937 (ATCC CRL-15932.2) e Hep-2 (ATCC CCL-23) in risposta all'infezione da *C. pneumoniae* (AR-39) (MOI: 3).

Nelle cellule Hep-2 infettate da *C. pneumoniae*, si è osservata una notevole diminuzione della concentrazione di GSH quando confrontata con la concentrazione rilevata nelle cellule Hep-2 non infettate, diminuzione che potrebbe spiegare l'elevata suscettibilità di queste cellule alla *C. pneumoniae*.

Al contrario nelle cellule U937 infettate da *C. pneumoniae* non si è osservata alcuna variazione della concentrazione di GSH quando confrontata con la concentrazione rilevata nelle cellule U937 non infettate. In questo caso sembra che le cellule U937 non risentano della infezione da *C. pneumoniae*.

Il dato che la *C. pneumoniae* non sia in grado di indurre uno stress ossidativo nelle cellule U937 potrebbe essere spiegato dalla particolare interazione che si stabilisce fra questo tipo di cellula ed il microrganismo o dalla capacità dei monociti di aumentare il livello di GSH modificando l'espressione degli enzimi coinvolti nel metabolismo del glutatone.

Ulteriori studi sono necessari per chiarire i meccanismi coinvolti nella regolazione dei livelli di GSH intracellulare nei monociti in seguito ad infezione da *C. pneumoniae*.

## ANALISI DELLA REGIONE TET(O)-MEF(A) IN UN ELEMENTO ORF3-NEGATIVO DI STREPTOCOCCUS PYOGENES.

E. Giovanetti, A. Brenciani, M. Vecchi, S. Menzo, P.E. Varaldo.

Istituto di Microbiologia e Scienze Biomediche, Università Politecnica delle Marche, Ancona.

Tn1207.1 (7,2 kb) è un trasposone non coniugativo di *Streptococcus pneumoniae* contenente 8 ORF, di cui la quarta è il gene *mef(A)*, che codifica una pompa responsabile della resistenza da efflusso ai macrolidi a 14 e 15 atomi. In *Streptococcus pyogenes* Tn1207.1 fa parte di elementi genetici di dimensioni maggiori, diversi nei ceppi sensibili (Tc<sup>S</sup>) o resistenti (Tc<sup>F</sup>) alla tetraciclina. Nei ceppi Tc<sup>S</sup> *mef(A)* è portato da Tn1207.3 (52 kb) o da un elemento chimerico di 58,8 kb, ambedue trasferibili, con uno stesso sito di inserzione cromosomica (*comEC*), e contenenti una copia completa di Tn1207.1. Nei ceppi Tc<sup>F</sup> *mef(A)* è portato da elementi *tet(O)-mef(A)* che hanno un sito di inserzione cromosomica diverso da *comEC* e contengono una copia incompleta e variabile di Tn1207.1, in cui sono sempre assenti *orf1* e *orf2* mentre *orf3* è presente in circa metà dei casi. Tutti gli elementi *mef(A)* di *S. pyogenes* sono associati a profagi, identici nel caso di Tn1207.3 e dell'elemento di 58,8 kb, mentre gli elementi *tet(O)-mef(A)* sono integrati in un profago differente. Recentemente abbiamo identificato una serie di nuovi geni nel tratto *tet(O)-mef(A)* di un ceppo *orf3*-positivo. Adesso, riportiamo e confrontiamo i risultati del sequenziamento della regione *tet(O)-mef(A)* di un ceppo *orf3*-negativo. Complessivamente, il tratto *tet(O)-mef(A)* è risultato sensibilmente più breve nell'elemento *orf3*-negativo (2,3 kb) che in quello *orf3*-positivo (5,5 kb). Ad una prima area di omologia con l'elemento *orf3*-positivo segue una delezione di 1980 bp, mentre le successive aree di omologia con l'elemento mega di *S. pneumoniae* risultano conservate. Una seconda delezione (1745 bp) si estende dall'inizio di Tn1207.1 a circa metà della regione intergenica che nel ceppo *orf3*-positivo precede *mef(A)*. Seguono quindi 740 bp in cui si evidenziano ampie zone di omologia con mega. Di particolare interesse è il fatto che, sia nell'elemento *orf3*-positivo che in quello *orf3*-negativo, la regione immediatamente a valle di *tet(O)* (1245 bp) mostra un'elevata omologia con plasmidi coniugativi *tet(O)*-positivi recentemente isolati e sequenziati in *Campylobacter*. Questi risultati confermano l'estrema variabilità degli elementi *tet(O)-mef(A)* di *S. pyogenes*. Le estese aree di omologia con l'elemento mega pneumococcico sono probabilmente il risultato di intensi scambi genetici tra *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*. Questa serie di eventi potrebbe spiegare come i geni *tet(O)* e *mef(A)*, ambedue non trasferibili in pneumococco, siano divenuti tali in seguito all'integrazione in diversi profagi in *S. pyogenes*.

## IL CHININO SOLFATO INIBISCE L'INVASIVITÀ DI ALCUNE SPECIE BATTERICHE IN CELLULE CACO-2

Grimaldi E., Solla D., Paoletti I., Auricchio L., Tufano M.A.  
Dipartimento di Medicina Sperimentale sezione di Microbiologia.  
Seconda Università degli Studi di Napoli

Benché l'utilizzo dei farmaci antimalarici sia primariamente mirato alla profilassi ed al trattamento della malaria, molti sono i pazienti che assumono antimalarici per il trattamento di patologie infiammatorie non infettive quali: lupus eritematoso, artrite reumatoide, alcune malattie del collagene, granuloma annulare, lichen planus ed altre. Lo stato di immunodepressione indotto da queste patologie e/o dai trattamenti terapeutici utilizzati, crea senza dubbio terreno favorevole alla potenziale sovrapposizione di infezioni batteriche che possono complicare il decorso della malattia. Considerando ciò l'azione antibatterica dei farmaci antimalarici potrebbe essere molto importante al fine di proteggere questi pazienti da sovrapposizioni batteriche ed avviare alla necessità di una terapia antibiotica aggiuntiva.

Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'effetto dell'antimalarico chinino solfato (QS) sulla crescita e sulla capacità invasiva di alcuni batteri che sono comunemente associati ad infezioni della cute e dei tessuti molli, al fine di determinare la capacità di questa molecola di indurre un effetto protettivo secondario nei confronti delle patologie indotte da questi microrganismi.

Per tali studi sono state utilizzate cellule Caco-2 infettate con una sospensione batterica di *Enterobacter agglomerans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, in fase di crescita logaritmica, per 120 min. a 37°C in presenza ed in assenza di QS alla concentrazione di 50 µM e 100 µM. L'efficienza d'invasività è stata espressa come numero di batteri internalizzati attraverso il conteggio delle CFU.

I dati ottenuti mostrano che la capacità invasiva di *E. agglomerans* e *S. aureus* risultano inibite in maniera dose-dipendente, mentre il QS non ha mostrato un effetto significativo sull'internalizzazione di *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Tali risultati suggeriscono che la terapia con QS, utilizzata nel trattamento di pazienti con patologie dermatologiche e reumatologiche autoimmuni e recentemente proposta come terapia adiuvante in pazienti HIV positivi, possa in qualche modo offrire un effetto protettivo anche nei confronti di microrganismi responsabili di infezioni superficiali e sistemiche comunemente riscontrabili in pazienti immunodepressi.

## IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEI GENI *HLY* E *IAP* NEI SIEROTIPI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* E COMPARAZIONE CON *LISTERIA SPP.*

M.A. Losso, S. Caracciolo, N. Chiarelli, S. M. Lepore, R. Vuono  
Dipartimento di Biologia Cellulare- Università della Calabria (Arcavacata di Rende)  
[losso@unical.it](mailto:losso@unical.it)

L'insorgenza di nuove patologie di origine batterica rappresenta una costante minaccia per la salute dell'uomo. Negli ultimi anni, nei quali sono stati pubblicati i genomi di circa 160 batteri, molti studi sono stati volti alla comprensione dei meccanismi implicati nella virulenza dei microrganismi patogeni. È stato così possibile identificare e caratterizzare regioni presenti nel cromosoma batterico contenenti i geni della virulenza, spesso associati in cluster, che vengono identificate col termine di "Isole di Patogenicità" o PAI. L'identificazione delle "Isole di Patogenicità" ha inoltre consentito di stabilire la storia evolutiva dei diversi microrganismi patogeni. Alla luce del nuovo interesse scientifico verso i microrganismi patogeni abbiamo focalizzato il nostro studio su *Listeria monocytogenes* responsabile di tossinfezioni alimentari nell'uomo e negli animali e indicato dalla Comunità Europea come patogeno emergente per l'aumento, negli ultimi anni, delle patologie ad esso collegate.

Nel nostro studio abbiamo isolato e caratterizzato i geni *hly* (listeriolysin O) e *iap* (proteina p60), associati alla virulenza, nei sierotipi 1/2c, 3a, 1/2b and 3b di *Listeria monocytogenes* appartenenti ad una collezione internazionale di ceppi puri.

L'analisi di sequenza e l'allineamento con le uniche sequenze ad oggi pubblicate dei sierogruppi 1/2a e 4b di *Listeria monocytogenes* ci hanno permesso di identificare inserzioni, delezioni e numerosi polimorfismi, alcuni dei quali inseriscono specifici siti di restrizione che ci hanno permesso di discriminare fra i sierogruppi *a* e *b* di *Listeria monocytogenes* e di identificare il sierogruppo 4b, maggiormente patogeno per l'uomo.

Abbiamo inoltre tipizzato nel gene *iap* del sierogruppo 1/2c di *Listeria monocytogenes* una inserzione di 18 nucleotidi, in posizione 977 del gene, assente negli altri sierogruppi, costituita da ripetizioni in tandem paragonabile ad una PAI.

La struttura secondaria da noi predetta della proteina p60, codificata dal gene *iap* e legata all'invasività di *Listeria monocytogenes*, ha mostrato divergenze nei diversi sierogruppi.

Abbiamo inoltre analizzato i domini funzionali della p60 in *Listeria monocytogenes*, confrontandoli con quelli delle proteine analoghe di *Listeria spp.*

## SCAMBIO DI MATERIALE GENETICO MEDIATO DALL' OZY.

C. Cassanelli, A. Marchese, E. A. Debbia.

Istituto di Microbiologia-Università di Genova

**OBIETTIVO:** Dimostrare come la combinazione di ozono e corrente alternata ad alta frequenza applicate ad una sospensione batterica, possono portare ad uno scambio di materiale genetico con un meccanismo simile a quello elettroporetico. La ricerca è stata effettuata utilizzando un apparecchio, Ozy, che tramite un elettrodo, ove passa corrente alternata ad alta frequenza, trasforma l'ossigeno atmosferico in ozono.

**MATERIALI E METODI:** È stato utilizzato come donatore un ceppo di *E.coli* K-12 C600 veicolante il plasmide pBP517(gyr A+) non coniugativo che conferisce la resistenza all' amikacina (Amk) e la sensibilità all'acido nalidixico (NAL) e, come ricevente, un C600 resistente alla rifampicina (Rif) e all'acido nalidixico. 0.1ml di donatore più 0.1 ml di ricevente sono stati trattati con Ozy per 1 minuto. La miscela è stata poi sospesa in un terreno di coltura ricco di zuccheri e messo ad incubare a 37°C per 4 ore. Un controllo, formato dalla miscela di donatore e ricevente è stato incubato per lo stesso periodo di tempo. Al termine dell'incubazione i ricombinanti sono stati seminati su terreno selettivo (Rif e Amk).

**RISULTATI:** Partendo da una concentrazione di circa  $10^7$  CFU/ml iniziale sono stati ottenuti 4 ricombinanti resistenti sia alla Rifampicina che alla Amikacina, mentre la mortalità delle cellule esposte ad Ozy si aggira intorno ai 2 log. Come ulteriore prova del passaggio del plasmide è stata verificata la sensibilità dei ricombinanti all'acido nalidixico .

**CONCLUSIONI:** Tramite l'utilizzo dell'Ozy sono stati ottenuti dei ricombinanti, con un meccanismo mediato non tanto dal campo elettromagnetico quanto dall'ozono che esso sprigiona. L'ozono infatti è una molecola che altera la permeabilità della membrana cellulare, provocando la rottura dei ponti S-S, che in qualche caso possono ricomporsi permettendo così l'incorporazione del materiale genetico. L'utilizzo dell'Ozy come presidio medico in casi di dermatiti e ascessi è in fase di studio, ma potrebbe essere un passo importante nello sviluppo dell'ozonoterapia

## ATTIVITÀ ANTIFUNGINA DEL PEPTIDE hLF(1-11) DERIVATO DALLA LATTOFERRINA UMANA VERSO UN'INFEZIONE DISSEMINATA SOSTENUTA DA *CANDIDA ALBICANS*

Antonella Lupetti,<sup>1</sup> Carlo P. J. M. Brouwer,<sup>3</sup> Sylvia J. P. Bogaards,<sup>2,3</sup> Mick M. Welling,<sup>4</sup> Emile de Heer,<sup>5</sup> Mario Campa,<sup>1</sup> Jaap T. van Dissel,<sup>2</sup> Robert E. H. Friesen,<sup>3</sup> Peter H. Nibbering<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, Università di Pisa, Pisa, Italia, <sup>2</sup>Dipartimento di Malattie Infettive, Leiden University Medical Center (LUMC), Leiden, <sup>3</sup>AM-Pharma, Bunnik, <sup>4</sup>Dipartimento di Radiologia, Divisione di Medicina Nucleare, LUMC, e <sup>5</sup>Dipartimento di Patologia, LUMC, Olanda.

Studi recenti hanno dimostrato che il peptide N terminale della lattoferrina umana, hLF(1-11), ha un'efficace attività di *killig in vitro* verso ceppi di *Candida albicans* fluconazolo resistenti. Nel presente studio sono stati valutati l'attività antifungina di tale peptide cationico verso un'infezione disseminata nel topo sostenuta da un ceppo di *Candida albicans* fluconazolo resistente e i meccanismi alla base di tale attività. I risultati hanno evidenziato che l'attività antifungina del peptide hLF(1-11) mostra una curva dose-effetto disposta a U. La scarsa attività antifungina delle alte dosi di questo peptide (400-40.000 µg/kg) coincide con alti livelli di IL-10 in circolo, mentre le dosi efficaci del peptide (0.04-40 µg/kg) sono associate a ridotti livelli sierici di TNF-α e IL-6 rispetto ai topi non trattati. L'analisi istologica del numero e della dimensione dei foci infettivi in sezioni di tessuto renale conferma i dati microbiologici. I topi riceventi un adeguato trattamento mostrano foci infettivi contenenti cellule di *C. albicans* prevalentemente in crescita blastoconidiale, mentre nei topi non trattati o trattati in modo inadeguato tali foci contengono principalmente forme filamentose di *C. albicans*. In accordo con questi dati, hLF(1-11) *in vitro* inibisce in modo dose-dipendente lo switching dei blastoconidi verso le forme filamentose di *C. albicans*.

In conclusione, il peptide hLF(1-11) è altamente efficace verso infezioni disseminate sostenute da *C. albicans* e tale attività coinvolge sia gli effetti del peptide sulle cellule di *C. albicans* sia sulle cellule del sistema immunitario dell'ospite.

## ASPETTI DI MICOLOGIA NELLE ACQUE RICREAZIONALI DELLA PISCINA COMUNALE DI PALERMO: RISULTATI PRELIMINARI

M.E. Milici, C.M. Maida

Dipartimento di Igiene e Microbiologia – sezione di microbiologia- Università di Palermo  
Via del Vespro 127, 90133 Palermo

Le piscine comunali sono, generalmente, frequentate da un numero piuttosto elevato di persone con età, condizioni di salute ed igienico-sanitarie differenti. Molto spesso, vengono organizzati dei corsi particolari per donne gravide, bambini, portatori di handicap ed anziani, maggiormente predisposti a contrarre infezioni da parte di microrganismi opportunisti e patogeni. In virtù del fatto che centinaia di utenti frequentano le piscine ogni giorno, calpestano le stesse superfici e nuotano nella stessa acqua, l'igiene delle superfici e la buona qualità delle acque sono requisiti fondamentali per la buona gestione di una piscina.

Il nostro studio presenta i risultati preliminari del monitoraggio della piscina comunale della città di Palermo per quanto riguarda i controlli micologici delle acque, dei sistemi di trattamento e delle superfici calpestabili della vasca coperta della piscina comunale. Sono stati effettuati 6 campionamenti, a distanza di un mese l'uno dall'altro, da Marzo ad Agosto, nelle ore di maggiore affluenza di utenza, e sono stati registrati i valori della temperatura dell'acqua, temperatura dell'aria, percentuale di umidità e concentrazione di cloro libero dell'acqua della vasca. I parametri micologici delle acque sono stati analizzati secondo metodiche standard (Standards Methods for Examination of Water and Wastewater, 1995), ovvero, tecnica delle membrane filtranti di volumi noti di acqua e successiva identificazione delle colonie.

Le analisi hanno evidenziato la presenza di specie appartenenti ai dermatofiti quali *Microsporum sp.*, e *Trichophyton mentagrophytes* e di altre specie quali *Acremonium sp.*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Candida sp.*, *Cephalosporium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Cryptococcus laurenti*, *Penicillium sp.*, *Phialophora sp.*, *Pullularia sp.*, *Rhodotorula minuta*, *Trichosporon sp.*, *Trichoderma sp.*, *Scedosporium sp.*, *Verticillium sp.*. Il ritrovamento di miceti potenzialmente patogeni, la loro resistenza alle normali concentrazioni di disinfettanti utilizzati per le acque di piscina (ipoclorito di sodio, max 1,5 mg/l) e la carenza di parametri micologici inseriti nei controlli contemplati dalla normativa vigente, dovrebbe far aumentare l'attenzione nei confronti dei parametri micologici da ricercare nelle acque ricreative delle piscine pubbliche.

## POTENZIALE EFFETTO PREBIOTICO DI OLIGOSACCARIDI ESTRATTI DAL BERGAMOTTO (Citrus Bergamia Risso)

G. Mandalari<sup>1</sup>, C. Nueno Palop<sup>2</sup>, K. Tuohy<sup>3</sup>, A. Narbad<sup>2</sup>, K. Waldron<sup>2</sup>, C.B. Faulds<sup>2</sup>, G. Bisignano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. Farmaco-Biologico, Università di Messina, <sup>2</sup>Institute of Food Research, Norwich (UK), <sup>3</sup>School of Food Biosciences, University of Reading (UK)

Il bergamotto (*Citrus bergamia* Risso) è un frutto tipico della provincia di Reggio Calabria (Italy), utilizzato prevalentemente per l'estrazione dell'olio essenziale dalla buccia. L'olio essenziale di bergamotto è ampiamente utilizzato nelle industrie alimentari e cosmetiche, nonché in campo farmaceutico anche per le sue proprietà antisettiche ed antibatteriche. La polpa di bergamotto rappresenta circa il 60% del peso totale dei frutti processati e rimane come scarto principale, causando notevoli problemi economici ed ambientali. Tuttavia contiene ancora composti ad alto valore aggiunto potenzialmente utilizzabili, come le pectine.

Con il termine "prebiotico" vengono indicati gli oligosaccaridi non digeribili degli alimenti che sono selettivamente fermentati nel colon, aumentando il numero di bifidobatteri e lattobacilli, noti per il loro effetto protettivo contro agenti patogeni.

In questo lavoro oligosaccaridi pectici isolati dalla polpa di bergamotto mediante trattamenti enzimatici sono stati studiati per il loro effetto prebiotico attraverso fermentazioni *in vitro* con batteri della flora intestinale (colture pure e miste).

Gli oligosaccaridi pectici estratti dal bergamotto sono stati utilizzati come fonti di carbonio per colture pure, precedentemente isolate da feci umane e caratterizzate mediante sequenziamento di regioni specifiche di 16S-rRNA. Le specie batteriche sono rappresentate da Lattobacilli (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. pentosus*, *L. acidophilus*), Bifidobatteri (*Bif. angulatum*, *Bif. longum*, *Bif. animalis*, *Bif. lactis*, *Bif. infantis*), Clostridi (*C. perfringens*, *C. innocuum*, *C. ramosum*), Bacteroides (*Bact. fragilis*, *Bact. distonis*, *Bact. ovatus*). Un modello originale di studio rappresentato da "colon intestinale (la parte prossimale, trasversale e distale del colon,) è stato utilizzato, quale ecosistema microbiologico ideale per studiare la fermentazione degli oligosaccaridi in colture miste.

I risultati hanno potuto dimostrare che gli oligosaccaridi del bergamotto hanno effetto prebiotico, stimolando la crescita di Bifidobatteri e Lattobacilli ed inibendo quella di Clostridi e Bacteroides. L'indice prebiotico (PI) è risultato superiore a quello ottenuto con i frutto-oligosaccaridi, noti per il loro effetto prebiotico.

## **EFFETTO DELLA BOMBESINA SULL'INFEZIONE DA HERPES SIMPLEX VIRUS IN CHERATINOCITI UMANI**

Perfetto B.1, Canozo N.1, Melito A.1, Stiuso P.2, Carteni M.3, Tufano M.A1.

Dipartimento di Medicina Sperimentale-<sup>1</sup>Sezione di Microbiologia-<sup>3</sup>Sezione Biotecnologie, SUN.

<sup>2</sup>Dipartimento di Biochimica e Biofisica, SUN.

Il virus dell'Herpes Simplex (HSV) infetta alcuni tipi cellulari, in particolare, durante le infezioni primarie o ricorrenti le cellule target per eccellenza sono quelle epiteliali e/o neuronali.

HSV infetta cellule epiteliali delle mucose compresi i cheratinociti, inducendo infiammazione, produzione di radicali liberi e danno tissutale. Neuron e cheratinociti presentano strette interazioni, attraverso, ad esempio, l' NGF (nerve growth factor) prodotto dai cheratinociti e attraverso neuropeptidi rilasciati a livello dei nervi periferici della cute che agiscono sulla funzionalità dei cheratinociti, fra i quali i peptidi correlati al gene della calcitonina, il VIP, la sostanza P, la bombesina etc. E' stato dimostrato che la bombesina ha un effetto proliferativo sui cheratinociti in assenza di EGF (Epithelial Growth Factor) ed un effetto sulla migrazione cellulare e sul riparo delle ferite.

Scopo del lavoro è stato quello di valutare, in un modello sperimentale che prevede l'uso di cheratinociti umani HaCat, l'effetto della bombesina sull'infezione da HSV 1. Lo stress ossidativo è stato valutato attraverso l'espressione di Malonaldeide (MDA), indice della perossidazione dei lipidi di membrana indotta dai radicali liberi, indici infiammatori come COX2 e IL-1 sono stati valutati mediante l'analisi dell'espressione genica in RT-PCR. Sono state inoltre analizzate le eventuali modificazioni citoscheletriche (actina e tubulina) in presenza di bombesina e virus, con tecniche di immunofluorescenza. La concentrazione di bombesina utilizzata è  $10^{-8}$ M, scelta dopo esperimenti preliminari dose/risposta.

I risultati ottenuti, mostrano che la bombesina riduce di circa il 30% il numero di placche indotte da HSV sui cheratinociti rispetto al controllo, induce perossidazione lipidica di membrana e modula l'espressione di COX2 e IL-1. Fino a che punto il danno ossidativo gioca un ruolo benefico per l'ospite nella limitazione dell'infezione virale è ancora largamente sconosciuto. L'effetto di accelerazione del riparo della ferita, ottenuto *in vitro* in esperimenti di *wound healing*, associato agli effetti osservati sull'invasività virale potrebbero far ritenere tale sostanza un rimedio efficace contro le infezioni da Herpes Simplex nella fase di penetrazione del virus e sul riparo del danno tissutale, suggerendo l'ipotesi di utilizzazione della molecola in associazione alle terapie convenzionali.

## **IDENTIFICAZIONE E SENSIBILITA' ANTIBIOTICA DI BATTERI ISOLATI DA PRODOTTI PROBIOTICI COMMERCIALIZZATI IN ITALIA**

Milazzo, I., Speciale, A., Puglisi, S., Blandino, G.

Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Ginecologiche, Università di Catania.

Ai batteri probiotici viene riconosciuto un ruolo nella prevenzione e nella terapia di alcune patologie. Sempre più frequentemente essi sono usati sia negli alimenti fermentati che negli integratori alimentari farmaceutici, ma la loro funzionalità è legata ad alcuni requisiti ecologici quali la vitalità e la capacità di adesione. Lo scopo di questo studio è stato quello di esaminare una serie di prodotti definiti "probiotici" commercializzati in Italia, verificando se contenessero realmente i ceppi di batteri dichiarati sulle etichette, ed inoltre testare la sensibilità antibiotica dei ceppi isolati da questi prodotti.

Undici integratori alimentari e 5 yogurt probiotici, acquistati rispettivamente in farmacia e nei supermercati, sono stati esaminati usando quattro diversi terreni di isolamento selettivo e impiegando condizioni di coltura standardizzate; l'identificazione è stata effettuata attraverso metodi convenzionali. La sensibilità antibiotica dei ceppi isolati dai prodotti esaminati è stata determinata mediante il metodo dell'E-test (ABBIodisk).

I nostri risultati dimostrano che 9 integratori alimentari e 2 yogurt probiotici indicano in etichetta specie che da noi non sono state isolate; ed inoltre abbiamo isolato patogeni potenziali come *Micromonas micros*. I lattobacilli hanno mostrato una resistenza antibiotica specie-dipendente. Per *Lactobacillus casei*, *L. salivarius* e *L. plantarum* è stata dimostrata una resistenza intrinseca ai glicopeptidi. Una resistenza atipica alla penicillina si è osservata in *L. acidophilus* e *L. bulgaricus* e all'eritromicina in *L. lactis* e *L. salivarius*. E' stato osservato un ampio range di MIC per cefalosporine e flurochinoloni ed una scarsa attività degli aminoglicosidi nei confronti dei ceppi di *Lactobacillus* isolati. Due dei quattro ceppi isolati di *Bifidobacterium* mostrano un'alta resistenza al trimethoprim/sulfametossazolo e ai fluorochinoloni.

In conclusione i nostri risultati indicano che, nelle etichette dei prodotti probiotici esaminati, viene segnalata la presenza di specie che noi non abbiamo isolato, ed in alcuni casi questi prodotti sono contaminati da potenziali patogeni. Sebbene la resistenza antibiotica dovrebbe essere auspicabile nei ceppi batterici impiegati per i prodotti probiotici, che appunto sono utilizzati in concomitanza all'assunzione di antibiotici, bisogna tener conto del fatto che la resistenza all'eritromicina e alla penicillina potrebbe essere trasferita a microrganismi presenti nel tratto intestinale.

## CRESCITA DI *ASPERGILLUS OCHRACEUS* E PRODUZIONE DI OCRATOSSINA A IN ARANCE ROSSE (*CITRUS SINENSIS*) CULTIVAR TAROCCO.

A. Marino, C. Fiorentino, G. Bisignano, A. Nostro, M. A. Cannatelli, F. Pizzimenti, G. Crisafi.

Dipartimento Farmaco-Biologico, Sezione di Microbiologia. Università degli Studi di Messina. Viale S. S. Annunziata 98168 Messina.

L'Ocratossina A (OTA) è una micotossina, con proprietà nefrotossiche, cancerogene, teratogene e immunosoppressive, pericolosa per la salute dell'uomo. Il regolamento (CE) definisce i tenori massimi consentiti di OTA nei cereali, nella frutta secca della vite, nel caffè, nel vino e prevede di fissare, in base ad una valutazione aggiornata dei rischi, il massimo consentito in altri prodotti alimentari. L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare, *in vitro*, la crescita di *Aspergillus ochraceus* e la produzione di Ocratossina A in lesioni su arance rosse (*Citrus sinensis*) cultivar Tarocco. L'infezione è stata causata inoculando 15 µl di una sospensione di circa  $5 \times 10^6$  spore/ml<sup>-1</sup> di *A. ochraceus* NRRL 3174 in lesioni precedentemente provocate nell'albedo. Le arance infettate sono state incubate a 4, 20 e 26°C. Dalla superficie delle arance incubate a 26 e 20°C, sono state rimosse delle sezioni discoidali, includenti le lesioni, per l'estrazione della tossina dopo 7 e 14 giorni rispettivamente. Inoltre, piastre di succo d'arancia agarizzato sono state seminate per verificare la crescita della muffa e la produzione di tossina nella polpa. Un saggio immunoenzimatico (ELISA) è stato utilizzato per l'analisi quantitativa della tossina estratta dai campioni con una miscela di metanolo e acido formico. I risultati sono stati elaborati mediante interpolazione. La crescita di *A. ochraceus* è stata riscontrata a 20 e a 26°C sia nelle lesioni che nella polpa. La concentrazione di Ocratossina A è risultata maggiore alla temperatura di 26°C. *Aspergillus ochraceus* tra i cosiddetti "storage fungi" può rappresentare un alto rischio di contaminazione per le arance durante lo stoccaggio e la trasformazione industriale.

## ECOLOGIA MICROBICA DELLA QUERCIA DA SUGHERO MEDIANTE *COMMUNITY LEVEL PHYSIOLOGICAL PROFILE* (CLPP)

R. Marongiu<sup>A</sup>, G. Garau<sup>B</sup>, M. Caredda<sup>B</sup>, M.G.Sanna<sup>B</sup> e P. Deiana<sup>B</sup>

<sup>A</sup> Dipartimento di Protezione delle Piante, Università di Sassari, V.le Italia, 39 - 07100 Sassari

<sup>B</sup> Dipartimento di Scienze Ambientali Agrarie e Biotecnologie Agro-Alimentari, Università di Sassari, V.le Italia, 39 - 07100 Sassari

Indirizzo e-mail del primo autore: rmarong@uniss.it

### Riassunto

Nell'ambito del progetto INTERREG III "Suberex" sono state intraprese una serie di attività di studio e monitoraggio del patrimonio boschivo a *Quercus suber* L. in due aree a vocazione subericola della Sardegna centrale al fine di individuare degli indicatori utili ad indirizzare scelte gestionali sostenibili e garanti della biodiversità. In questo contesto è stata realizzata un'attività di monitoraggio della componente microbica associata alla rizosfera di piante di *Q. suber* presenti in nove siti contraddistinti da diverse forme di gestione del soprassuolo. Sono state considerate sugherete sottoposte a lavorazioni, prive della componente arbustiva, percorse da incendio e pascolate. I campionamenti sono stati effettuati nel periodo primaverile in cui l'attività microbica è massima.

La caratterizzazione della versatilità catabolica e funzionale dei microrganismi presenti nei diversi siti è stata effettuata tramite l'analisi del profilo metabolico (Biolog CLPP, *Community Level Physiological Profile*).

I risultati ottenuti hanno evidenziato che le comunità microbiche presenti nei siti ove l'impatto antropico era limitato al pascolo con un carico di bestiame sostenibile presentavano una maggiore attività e diversità metabolica rispetto ai siti con carico di bestiame eccessivo. I siti in cui sono state eseguite delle lavorazioni presentavano valori più bassi dei parametri considerati rispetto a quelli riscontrati nei siti non lavorati. Anche i siti percorsi da incendio presentavano attività e diversità minori. In definitiva i siti nei quali i microrganismi hanno mostrato una maggiore attività e diversità funzionale sono stati quelli gestiti in modo equilibrato e non percorsi da incendio.

## NUOVO SAGGIO PER LA VALUTAZIONE DELL'INIBIZIONE DELLA TRASCRITTASI INVERSA DI HTLV-1

Balestrieri E.<sup>1</sup>, Sciortino M.T.<sup>2</sup>, Barbagallo L.<sup>1</sup>, Macchi B.<sup>1</sup>, Mastino A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Neuroscienze, Univ. di Roma 'Tor Vergata', Roma; <sup>2</sup>Dip. di Sc. Microbiologiche, Genetiche e Molecolari, Univ. di Messina, Messina.

L'HTLV-1, retrovirus umano associato con malattie linfoproliferative, è in grado di replicarsi, come tutti i retrovirus, grazie all'attività di una trascrittasi inversa (RT) virale. La capacità di composti nucleosidici o non-nucleosidici di inibire la replicazione di HTLV-1 è stata dimostrata in vitro da noi ed altri autori mediante vari saggi. Per migliorare la possibilità di indagare l'efficacia di composti attivi verso HTLV-1, abbiamo messo a punto e standardizzato un nuovo saggio "cell-free" specifico per la RT di HTLV-1. Il saggio si basa essenzialmente su una reazione standard di RT-PCR specifica. Come stampo per la retrotrascrizione, abbiamo utilizzato dell'RNA isolato da cellule trasfettate stabilmente, esprimenti ectopicamente la glicoproteina D (gD) of HSV-1. Come fonte di RT di HTLV-1, abbiamo utilizzato una preparazione cruda derivata da cellule MT-2 cronicamente infette da HTLV-1. Per valutare l'attività di inibizione della RT di HTLV-1 la reazione di RT-PCR è stata eseguita dopo aggiunta di varie concentrazioni di farmaci di cui era già nota la capacità di inibizione della RT di HTLV-1, come la AZT, o di farmaci potenzialmente in grado di svolgere tale azione, quali il 3TC, il tenofovir o alcuni fosfonati nucleosidici di nuova sintesi. I composti nucleosidici o nucleotidici sono stati preattivati in vitro mediante esposizione ad un estratto acellulare di linfomonociti di sangue periferico. Il saggio è stato eseguito predisponendo adeguati controlli per verificare l'assenza di attività retrotrascrittasi o di inibizione aspecifiche. I risultati hanno mostrato che: i) la preparazione da cellule MT-2 determinava una evidente attività di retrotrascrizione specifica, ii) l'AZT, il tenofovir e alcuni dei nuovi composti preattivati erano capaci di inibire l'attività della RT di HTLV-1 già a concentrazioni originali 0.1-10 nM. Questo nuovo saggio, semplice e relativamente economico, può risultare molto utile per un rapido screening di nuovi prodotti antivirali dotati di attività specifica anti-HTLV-1 in condizioni di biosicurezza, senza utilizzazione di virus infettante.

## CARATTERIZZAZIONE PRELIMINARE DI LAB PRODUTTORI DI BATTERIOCINE ISOLATI DA SALSICCIA SARDA TRADIZIONALE.

Merella Roberto, Mangia Nicoletta P., Garau Giovanni, Murgia Marco A., Deiana Pietrino.  
Dipartimento di Scienze Ambientali Agrarie e Biotecnologie Agroalimentari.

La salsiccia sarda tradizionale è caratterizzata da una microflora fermentante costituita principalmente da batteri lattici (LAB), micrococcaceae e lieviti. Fra le azioni importanti dei LAB, oltre all'azione fermentante risulta importante quella battericida che possono esplicare nei confronti dei batteri patogeni.

La crescente domanda, da parte del consumatore, di prodotti senza l'aggiunta di conservanti ha portato tra le varie conseguenze ad una rivalutazione delle batteriocine come antimicrobici naturali e quindi ad un maggiore interesse verso l'impiego, nei processi produttivi, di batteri lattici produttori di batteriocine.

Scopo di questo lavoro è quello di ottenere una banca di batteri lattici produttori di batteriocine attive contro i batteri patogeni potenzialmente presenti nei prodotti carnei.

La ricerca, da considerarsi preliminare, è stata condotta su campioni di salsiccia sarda proveniente da tre zone della Sardegna e in diverse fasi di stagionatura (7 e 21 gg). Dei complessivi 150 stipiti di LAB isolati 50 sono stati caratterizzati per velocità di crescita, attività acidificante e capacità a produrre batteriocine (agar well diffusion method).

Al fine di valutare l'attività battericida dei LAB sono stati impiegati come ceppi target: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *typhimurium*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Propionibacterium thoenii*, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, *Propionibacterium jensenii*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus plantarum*.

Fra i ceppi saggiati 25 hanno mostrato una attività battericida nei confronti di almeno una specie target:

13 ceppi nei confronti di *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*,

9 ceppi nei confronti di *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*,

8 ceppi nei confronti di *Salmonella choleraesuis* subsp. *typhimurium*,

1 ceppo nei confronti di *Propionibacterium acidipropionici*,

1 ceppo nei confronti di *Propionibacterium thoenii*.

Un unico ceppo, cd21, ha mostrato attività inibente nei confronti di tre diverse specie di target: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *typhimurium* e *Propionibacterium thoenii*.

## STUDIO DELL'EFFICACIA DI BIS-(1-HYDROXY-2,2,6,6,-TETRAMETHYL-4-PIPERIDINYL) DECANDIOATE IN UN MODELLO MURINO DI SHOCK SETTICO.

<sup>1</sup>A.T. Palamara, <sup>1</sup>L. Nencioni, <sup>2</sup>R. Sgarbanti, <sup>2</sup>G. Febbraro, <sup>2</sup>C. D'Agostini, <sup>3</sup>M. Mattei, <sup>2</sup>E. Garaci.

<sup>1</sup>Dip. Sc. San. Pub., Univ.Roma "La Sapienza"; <sup>2</sup>Dip. Med. Sper.; <sup>3</sup>Centro Serv. Interdip. STA, Univ.Roma "Tor Vergata"

La sepsi è una sindrome clinica definita come una risposta sistemica dell'ospite ad una severa infezione ed è associata con un alto grado di mortalità in tutti i pazienti ospedalizzati ed in terapia intensiva. Molti degli eventi fisiopatologici locali e sistemici sono dovuti alla capacità dell'endotossina batterica (LPS) di indurre cellule ematiche ed endoteliali a rilasciare numerosi mediatori dell'infiammazione fra cui citochine pro-infiammatorie come TNF- $\alpha$  e radicali liberi dell'ossigeno (ROS). L'aumento intracellulare di quest'ultimi provoca un'alterazione dello stato ossido-riduttivo in senso pro-ossidante che può indurre danni diretti a varie strutture cellulari (membrane, acidi nucleici, proteine). La correzione dello stress ossidativo, quindi, rappresenta un obiettivo importante per il controllo dell'evoluzione del quadro clinico. E' noto, infatti, che l'aggiunta di sostanze antiossidanti previene il danno cellulare dovuto all'eccesso dei ROS ed interferisce con fasi precoci del processo infiammatorio. Nonostante la mole di studi sul meccanismo di molecole coinvolte nella patologia dello shock settico, ad oggi non sono state ancora identificate strategie terapeutiche di reale efficacia.

L'obiettivo dello studio è consistito nella valutazione dell'efficacia terapeutica di bis-(1-idrossi-2,2,6,6,-tetrametil-4-piperidinil)decandioate, molecola nota per la sua attività antiossidante, in un modello murino di shock settico da LPS. A tal fine, topi BALB/c femmine sono stati trattati i.p. con dosi di LPS che provocavano una mortalità del 90% (DL90) o del 50% (DL50) e, dopo 20 minuti, sono stati inoculati i.p. con il farmaco alla dose di 1 mg/topo.

I risultati ottenuti hanno indicato che la somministrazione della molecola, inocolata nel modello con una DL90, incrementava la sopravvivenza dei topi del 40%. Nel gruppo di animali trattati con la DL50, la stessa dose di farmaco era in grado di indurre la sopravvivenza del 100% degli animali. Inoltre, al fine di valutare l'effetto della molecola sulla risposta infiammatoria, sono stati dosati i livelli sierici di TNF- $\alpha$  mediante test-ELISA. Il dosaggio, effettuato su campioni di sangue prelevati dal plesso retro-orbitale di animali trattati o non con l'antiossidante, ha indicato che la quantità di TNF- $\alpha$  nei topi trattati con bis-(1-idrossi-2,2,6,6,-tetrametil-4-piperidinil)decandioate diminuiva significativamente ( $P=0.003$ ) rispetto a quella nel gruppo di controllo.

Complessivamente i risultati ottenuti mostrano che bis-(1-idrossi-2,2,6,6,-tetrametil-4-piperidinil)decandioate è altamente efficace nel proteggere gli animali dallo shock settico da LPS e nel ridurre il rilascio di mediatori dell'infiammazione suggerendo il potenziale utilizzo di molecole ad attività antiossidante nel trattamento della sepsi *in vivo*.

## EFFICACIA DI UN NUOVO IRRIGANTE NEL TRATTAMENTO DI CANALI RADICOLARI INFETTATI CON *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Rachele Neglia<sup>o</sup>, Emanuele Ambu\*, Luciano Giardino#, Elisabetta Blasi<sup>o</sup>

<sup>o</sup> Dipartimento di Scienze Igienistiche, Microbiologiche e Biostatistiche, Università di Modena e Reggio Emilia; \* Clinica Odontoiatrica, Policlinico di Modena; # Università di Brescia

**Introduzione:** I principali obiettivi del trattamento di canali radicolari infetti (rimozione meccanica della polpa e trattamento con irriganti endocanalari) sono l'eliminazione dei microrganismi presenti nei canali e nei tubuli dentinali e la prevenzione della ricontaminazione dopo trattamento. Le terapie endodontiche consistono pertanto nella gestione di un problema microbiologico rappresentato soprattutto da *Candida albicans* e da *Enterococcus faecalis*, anaerobio facoltativo e generalmente resistente agli antimicrobici, isolato da infezioni pulpari e con frequenza molto maggiore (48.5% dei casi; Perrini *et al.*, 2002) in caso di fallimento della terapia endodontica associata alla persistenza batterica in recessi e diverticoli dei denti trattati.

Si riportano i dati di uno studio preliminare *in vitro* sull'efficacia nei riguardi *E. faecalis* di un nuovo irrigante, Tetraclean (costituito da un derivato della tetraciclina, un acido e un detergente) rispetto all'ipoclorito al 5.25% attualmente utilizzato.

**Materiali e Metodi** - Valutazione *in vitro* dell'attività dell'irrigante su ceppi (di recente isolamento e di collezione) di *C. albicans* e *E. faecalis* in funzione della concentrazione (per diluizione su agar secondo NCCLS) e del tempo di contatto (in sospensione). E' stata inoltre valutata (per conta vitale) l'attività, nel tempo e a 2 diverse temperature d'impiego, su denti monoradicoli (estratti, decoronati, sagomati a diametro apicale 0.20 mm, sterilizzati) infettati per 24 ore con *E. faecalis*

**Risultati** - *In vitro*, Tetraclean si è rivelato ancora attivo sui ceppi di *E. faecalis* fino all'intervallo di diluizione 1024 (pari a 9,7 mg/L di antibiotico) - 2048; diversamente, ipoclorito (5,25%), inibisce solo il 50% dei ceppi. In studi di sopravvivenza in funzione del tempo di contatto, Tetraclean provoca un abbattimento della conta vitale di 3 log a 5' e fino a 5 log in 10'. Nel dente infettato, Tetraclean determina l'abbattimento completo delle CFU (100% dei denti) con tempi diversi in funzione della temperatura, l'ipoclorito consente una ricolonizzazione nel 20% dei denti trattati.

**Conclusioni** - Lo studio fornisce indicazioni preliminari sulla particolare efficacia del Tetraclean nel controllare la presenza microbica all'interno dei canali radicolari, incluso *E. faecalis* più favorito dall'ambiente.

## ANALISI PROTEOMICA DI NEISSERIA MENINGITIDIS SIEROGRUPPO B MC58

Paola Stefanelli\*, Giuseppina Mignogna#, Arianna Neri\*, Alessandra Giorgi#, Gianni Colotti§, Bruno Maras#, M. Eugenia Schininà#

\* Dipartimento Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma

# Dipartimento Scienze Biochimiche "A. Rossi Fanelli" Università "La Sapienza" Roma

§ Istituto Biologia e Patologia Molecolari C.N.R. Roma

*Neisseria meningitidis*, causa di setticemia e meningite, rappresenta uno dei principali fattori di mortalità e morbilità soprattutto nei bambini di età inferiore a 5 anni.

L'analisi genomica del ceppo MC58 di meningococco di sierogruppo B, ancora orfano di un vaccino "universale", ha reso possibile l'identificazione di 2158 geni, anche se molte delle Open Reading Frames (ORFs) sono tuttora prive di funzioni assegnate. Il presente studio ha utilizzato il sierogruppo B di *N. meningitidis* per realizzarne una mappa di riferimento proteomica. Un catalogo affidabile e rapido delle proteine espresse in *N. meningitidis* di sierogruppo B in diverse condizioni di crescita, è stato ottenuto mediante un'analisi del proteoma basata sull'uso di minigels 2-DE in seguito ad una particolare procedura di frazionamento proteico.

In particolare, la sospensione batterica (circa 2McF) è stata sonicata per 10 sec a 0°C e, dopo un pretrattamento con 150 U di DNasiI (Roche Diagnostic), è stata centrifugata a 14000 x g per 10 min a 4°C: il supernatante ottenuto (frazione A), è stato desalinizzato con un kit PlusOne 2D clean-up (Amersham Biosciences) e risospeso in 10mM Tris HCl, urea 5M, tiourea 2M, CHAPS 2% p/v, DTT 50mM, anfoliti con range di pH da 3 a 10 0.2% v/v (Bio-Lytes, Bio-Rad), bromofenolo 0.001% p/v, a pH 7.4, mentre il pellet, risospeso in 40mM Tris HCl, urea 8M, CHAPS 2% w/v, DTT 50mM, Bio-Lytes pH 3-10 0.2% v/v, EDTA 1mM e inibitori delle proteasi 0.3 mg/mL, a pH 7.4, è stato nuovamente centrifugato. Il supernatante (frazione B) è stato a sua volta risospeso con lo stesso tampone utilizzato nel passaggio estrattivo precedente (C). L'approccio combinato di prefrazionamento estrattivo, uso di mini-gels 2-DE e MALDI-ToF, ha permesso di identificare 238 proteine, derivate da 116 geni, con diverse funzioni cellulari. Il metodo utilizzato in questo studio, più rapido ed economico di quelli tradizionali, ha portato inoltre, ad identificare 33 proteine non annotate in precedenti studi di proteomica realizzati su altri sierogruppi di *N. meningitidis*, ed a indicare per esse una specifica funzione. Questo metodo potrà essere utilizzato per analisi comparative relative alla composizione proteica presente in *N. meningitidis* in diverse condizioni di crescita, pH, stress o adesione a cellule dell'ospite e quindi per la conoscenza di come questo batterio sia in grado di rispondere ai cambiamenti ambientali e/o a trattamenti farmacologici durante l'infezione dell'ospite."

## IL 3-O-METHYLFUNICONE, PRODOTTO DA *PENICILLIUM PINOPHILUM*, INIBISCE LA MOTILITÀ DELLE CELLULE MCF-7 RIDUCENDO L'ESPRESSIONE DELL'INTEGRINA $\alpha$ V $\beta$ 5.

\*E. Buommino, \*M. Orlando, \*A. De Filippis, §V. Cozza, \*M. Petrazzuolo, °M. Boccellino, °L. Quagliuolo, \$R. Nicoletti, \*M.A. Tufano

\*Dipartimento di Medicina Sperimentale-Sezione di Microbiologia, SUN.

°Dipartimento di Biochimica e Biofisica, SUN.

§Dipartimento di Strategie Aziendali e Metodologie Quantitative, Università degli Studi di Napoli, Federico II.

\$Istituto Sperimentale del Tabacco, Scafati (NA)

Le integrine e le metalloproteinasi (MMPs) hanno un ruolo importante nel regolare i processi alla base della migrazione delle cellule tumorali, mediando l'attacco alla matrice extracellulare. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di dimostrare se il 3-O-methylfunicone (OMF), prodotto dal fungo *Penicillium pinophilum*, avesse la capacità di interferire nella proliferazione e nella motilità delle cellule tumorali di mammella. Sono state adoperate cellule epiteliali derivate da carcinoma mammario (MCF7) e cellule epiteliali di mammella normale (MCF10).

La proliferazione delle cellule MCF7 trattate con 80 mg di OMF diminuiva del 36% dopo 24 ore di trattamento, rispetto al controllo. Gli stessi effetti non erano evidenti sulle cellule MCF10. Allo stesso modo studi di motilità, analizzata mediante cinematografia "time lapse", mostravano che solo le cellule MCF7, trattate con OMF per 24 ore, subivano un arresto nella migrazione. Questo effetto non si verificava sulle cellule MCF-10. Poiché è noto che l'inibizione della motilità cellulare è associata ad una modifica della forma cellulare e della distribuzione delle fibre di tubulina, siamo andati a verificare le eventuali modifiche a carico del citoscheletro, utilizzando anticorpi fluoresceinati anti tubulina. Questo saggio ha confermato l'effetto selettivo della sostanza nei confronti delle cellule MCF7 evidenziando una nuova distribuzione delle fibre di tubulina, con evidente modifica della morfologia cellulare, rispetto al controllo non trattato o alle MCF10. Inoltre, abbiamo dimostrato che il metabolita agisce inibendo la secrezione delle MMP9 nelle cellule MCF7 trattate, e riduce l'espressione della integrina  $\alpha$ V $\beta$ 5. Infine, è stato riscontrato che l'OMF inibisce fortemente l'espressione dei geni survivin e hTERT.

I risultati di questi studi indicano che l'OMF inibisce la motilità cellulare attraverso la modulazione dell'integrina  $\alpha$ V $\beta$ 5 e riduce la secrezione della MMP9. L'inibizione dei tipici markers di progressione tumorale quali hTERT e survivin nelle cellule MCF-7, associata alla mancata attività sulle cellule non tumorali MCF-10, propone un potenziale uso dell'OMF nella terapia anticancro.

## LA VIOLACEINA COME RISPOSTA ALLO STRESS AMBIENTALE IN *JANTHINOBACTERIUM LIVIDUM*

Fabrizio Pantanella, Francesca Berlutti, Claudio Passariello, Serena Sarli, Clara Morea, Serena Schippa.

Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, Università di Roma "La Sapienza", piazzale A.Moro 5 – 00185 Roma, Italia

*Janthinobacterium lividum* è un microrganismo gram negativo, mobile, aerobio, comunemente presente nel suolo e rive lacustri. Nonostante il suo habitat, *J. lividum* riveste un interesse di carattere medico in seguito alla recente segnalazione di alcuni casi di setticemia, ed in quanto produttore di metallo- $\beta$ -lattamasi. Caratteristica peculiare di *J. lividum* è la produzione di un pigmento viola noto come violaceina.

La maggior parte delle conoscenze sulla violaceina provengono da studi eseguiti su *Chromobacterium violaceum* focalizzati sulle proprietà chimiche e farmacologiche del pigmento.

E' stato dimostrato che la violaceina ha un'attività antibatterica, antivirale e antitumorale, inoltre recentemente è stata utilizzata per colorare fibre sintetiche e naturali.

Al fine di comprendere la funzione fisiologica della violaceina in *J. lividum*, abbiamo seguito la sua produzione in diverse condizioni di crescita. I nostri risultati indicano che la produzione del pigmento violaceina dipende dalla fonte di carbonio e dalle condizioni di agitazione della coltura. In aggiunta abbiamo osservato una correlazione diretta tra capacità adesiva, produzione di biofilm e pigmento.

La produzione di violaceina sembra inoltre direttamente proporzionale alla concentrazione di ampicillina aggiunta nel mezzo, suggerendo che la violaceina potrebbe essere coinvolta nella risposta allo stress ambientale e contribuire alla persistenza batterica in ambienti sfavorevoli. In tal senso possono essere ricondotte le osservazioni fatte sulla vitalità di *J. lividum* nella tarda fase di morte della curva di crescita. Cellule pigmentate infatti sopravvivono più a lungo di quelle che non hanno prodotto violaceina.

Attivando espressioni geniche e inibendone altre i batteri reagiscono agli stress ambientali, in questo modo sopravvivono alle diverse pressioni selettive operate dai cambiamenti fisico-chimici tipici dell'ambiente naturale, aumentando le probabilità di conservazione della specie.

La produzione della violaceina potrebbe avvantaggiare *J. lividum* in condizioni di crescita sessili, correlate all'adesione al substrato, aumentando i tempi di sopravvivenza del microrganismo in condizioni "temporaneamente" sfavorevoli.

## CARATTERIZZAZIONE DI ATTINOMICETI, PRODUTTORI DI SOSTANZE AD ATTIVITA' ANTIBIOTICHE VERSO MICOBATTERI MDR, TRAMITE TECNICA AFLP.

V.A. Gennarino, S. Reale, S. Caracappa, F. Vitale, e F. Misuraca\*.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo

\*Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università di Palermo

[sreale@pa.izs.it](mailto:sreale@pa.izs.it)

Gli autori di questo lavoro illustrano un'analisi tassonomica e filogenetica di attinomiceti di nuovo isolamento che mostrano attività antimicrobica contro alcuni ceppi di micobatteri MDR (*Multi Drug Resistant*) resistenti ai classici antibiotici. Sono stati studiati in particolare, 6 ceppi denominati: 6VS, 5DN, 17PO, 2FG, 11 $\psi$ , 31VS, in base alle proprietà inibenti i Micobatteri. I ceppi sono stati sottoposti ad analisi di "fingerprinting" molecolare mediante AFLP (*Arbitrary Fragment Length Polymorfism*) che utilizza coppie di "primer" scelti in base al rapporto AT/GC dei cromosomi batterici. L'analisi dei dati è stata sviluppata con l'ausilio del software "genescan" che si basa sulla registrazione dei tempi di uscita dei picchi relativi alle varie bande di amplificazione. Le bande visualizzate riflettono la differente e caratteristica distribuzione dei siti per alcuni enzimi di restrizione (MseI e EcoRI). La successiva analisi dei ferogrammi evidenzia particolari picchi, peculiari per il DNA di alcuni ceppi esaminati, così come le altezze dei picchi relativi ai frammenti di restrizione. L'uso dell'indice di Jaccard ( $S_{JK}$ ) ha permesso di riunire i dati in una matrice bidirezionale in cui gli indici, calcolati sperimentalmente, rappresentano un parametro di distanza filogenetica relativa tra i ceppi. Il programma "Cluster" permette poi di ottenere varie forme di rappresentazioni grafiche. Questo sistema ci permette di visualizzare e calcolare in maniera intuitiva le distanze genetiche tra i vari ceppi, o il grado di parentela relativamente alla distanza fisica dei diversi luoghi di isolamento. I ceppi in oggetto derivano, infatti, dal suolo e sono stati individuati in terreni altamente contaminati dove la pressione selettiva ha permesso lo sviluppo solo degli stipti maggiormente resistenti a insidie di vario genere. La ricerca ha quindi permesso di sviluppare un sistema di indagine utile alla creazione di una banca dati implementabile in funzione di nuovi isolamenti e dalla quale si evincono informazioni sull'identità degli stipti.

## AUMENTATA ESPRESSIONE DI BCL-2 IN CELLULE WEHI-3B/CTR CON SPECIFICA RESISTENZA A TOSSINA COLERICA.

Augusto Pessina (1), Cristina Croera(2), Arianna Bonomi(1), Laura Daprai(1) Loredana Cavicchini(1), Alessandro Raimondi(1), Rosalia Ticozzi (1) e Maria Grazia Neri (1).

(1)Istituto di Microbiologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Milano.

(2)Ecvam , Joint Research Centre, Ispra (Va ) , Italy.

La diversa sensibilità di cellule animali all'azione di tossina colerica (TC) sulla crescita e sulla proliferazione cellulare dipende dal tipo di recettore gangliosidico di membrana presente, da differenti meccanismi di traduzione attivati e probabilmente anche dalla attivazione di meccanismi di resistenza. In precedenti studi si è osservato che cellule di leucemia murina WEHI-3B, stimolate con tossina colerica, accumulano cAMP intracellulare mentre cellule resistenti WEHI 3B/CTR (prive di ganglioside Gal-Gal-NacGM1b) non mostrano alcun significativo aumento di cAMP. In questa nuova ricerca si è studiato l'effetto di TC su: clonogenicità in vitro, valore di Population Doubling Time (PDT), apoptosi, attivazione di Proteina Kinasi A ed espressione di Bax e Bcl-2 nelle due linee cellulari (parentale e subclone resistente a TC).

In cellule WEHI-3B il notevole accumulo di cAMP indotto da TC sembra altamente correlato alla attivazione di PKA, all'aumento del valore di PDT, alla inibizione della clonogenicità ed all'imponente fenomeno di apoptosi. Il trattamento con H-89 inibisce l'attivazione di PKA da parte di TC ma non protegge le cellule dalla apoptosi e dalla inibizione della proliferazione.

In cellule resistenti (WEHI-3B/CTR) la stimolazione con TC non produce aumento di cAMP, di PDT, non provoca apoptosi e non attiva la PKA. In queste cellule, resistenti alla apoptosi TC-indotta, si osserva un notevolmente aumento dell'espressione di BCL-2 che, tuttavia, non è in grado di proteggere le cellule da apoptosi se indotta con altre sostanze come ciprofloxacina (CPX). Anche un subclone specificamente resistente a CPX (WEHI-3B/CPX) presenta una aumentata espressione di BCL-2 e, a sua volta, non è protetto dalla apoptosi indotta con TC.

Considerati globalmente questi risultati suggeriscono il ruolo dell'attivazione di PKA da parte di TC nell'inibizione della proliferazione cellulare di WEHI-3B indicando che l'aumentata espressione di BCL-2 nel subclone resistente a TC contribuisce a proteggere specificamente queste cellule dalla apoptosi indotta dalla tossina.

L'omogeneità genetica di questo modello cellulare costituito dalla linea parentale sensibile e da due subcloni con resistenza specifica non crociata, verso TC e CPX, rappresenta uno strumento interessante per meglio comprendere le relazioni esistenti tra i meccanismi di traduzione del segnale indotto da TC e l'espressione e la funzione di BCL-2 in queste linee cellulari.

## POSSIBILE RUOLO DEL POLIOMAVIRUS UMANO BK NELL'INDUZIONE DELLA TRASFORMAZIONE DI CELLULE DI TESSUTO PROSTATICO UMANO: STUDIO MOLECOLARE.

V. Pietropaolo<sup>1</sup>, M. Mischitelli<sup>1</sup>, D. Fioriti<sup>1</sup>, E. Anzivino<sup>1</sup>, F. Di Monaco<sup>2</sup>, A.M. Degener<sup>3</sup>, R. Nardacci<sup>4</sup>, M. Piacentini<sup>5</sup>, G. Russo<sup>6,7</sup>, A. Giordano<sup>6,7</sup>, F. Chiarini<sup>1</sup>, F. Di Silverio<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Dip. Scienze di Sanità Pubblica, <sup>2</sup>Dip. Urologia, <sup>3</sup>Dip. Medicina Sperimentale e Patologia, Univ. "La Sapienza" Roma; <sup>4</sup>Ist. Nazionale per le Malattie Infettive "Lazzaro Spallanzani", <sup>5</sup>Dip. Biologia, Univ. "Tor Vergata" Roma. <sup>6</sup>Ist. Sbarro per la Ricerca sul Cancro e Medicina Molecolare, Centro di Biotecnologie, Temple University, Philadelphia, USA, <sup>7</sup>Dip. Patologia Umana e Oncologia, Univ. di Siena.

Il poliomavirus umano BK (BKV), isolato nel 1971 dalle urine di un paziente sottoposto a trapianto renale, infetta l'uomo nell'infanzia con una sieroprevalenza del 70%–80% nell'età adulta. L'infezione primaria decorre in maniera subclinica. Nell'ospite immunocompetente il virus persiste probabilmente a livello renale allo stato latente. Il BKV è stato anche associato a fenomeni di trasformazione neoplastica (tumori cerebrali, insulinomi, carcinomi renali, tumori della prostata). Anche se una relazione causale ancora non è stata dimostrata, il ritrovamento del DNA di BKV in questi tumori permette di ipotizzare un ruolo del virus in tali neoplasie. Le proteine virali precoci (Ag-T e Ag-t) sono coinvolte nella trasformazione oncogenica. Tuttavia la sola espressione dell'Ag-T non sembra sufficiente per l'induzione della trasformazione neoplastica che si ottiene invece mediante interazione con altre proteine cellulari, come p53. In questa ricerca è stata studiata la possibile correlazione tra infezione da BKV ed induzione e progressione del carcinoma della prostata, in campioni di adenocarcinoma prostatico. I tumori, classificati secondo TNM e Gleason (GS), sono stati analizzati per la presenza di sequenze di BKV. Sono state eseguite PCR con primer specifici per l'Ag-T e analisi immunostochimiche con anticorpi specifici per Ag-T, p53 e transglutaminas II (TG2). I risultati hanno mostrato che 4/6 campioni erano positivi per sequenze genomiche codificanti Ag-T e negli stessi campioni le analisi immunostochimiche hanno evidenziato la presenza della proteina Ag-T. Si è poi riscontrata un'associazione del GS con l'espressione di p53 e TG2, entrambe considerate marcatori per l'adenocarcinoma prostatico. Sebbene i nostri risultati avvalorino l'ipotesi di un coinvolgimento di BKV nella tumorigenesi della prostata, lo studio di un maggior numero di campioni è necessario per chiarire il ruolo svolto dal virus nell'innescare o nella progressione neoplastica delle cellule prostatiche.

## ATTIVITA' ANTIMICROBICA DELL'OLIO ESSENZIALE DI BERGAMOTTO SU *PROPIONIBACTERIUM ACNES*

F.C.Pizzimenti, A.Marino, A.Nostro, A. Pizzimenti\*, V.Sdrafkakis,

Dipartimento Farmaco-Biologico- Facoltà di Farmacia –Università di Messina

\* Dipartimento di Sanità Pubblica – Facoltà di Medicina Veterinaria- Università di Messina

### Riassunto

Gli oli essenziali sono una miscela di composti volatili, prevalentemente costituiti da terpeni e loro derivati ossigenati, alcoli, esteri e composti carbonilici ,prodotti da molte piante o da loro frutti.

Gli oli essenziali sono stati usati ,per molti scopi, già da tempo nella medicina tradizionale di molti Paesi e da parecchi anni si sta indagando sulle loro attività terapeutiche. In particolare ultimamente è stata studiata l'attività antimicrobica contro batteri, funghi e lieviti.(Pai and Platt 1995, F.Pizzimenti 2000) e sono state condotte ricerche per le potenziali applicazioni nell'industria cosmetica (F. Pizzimenti 2004) ed alimentare con attività conservante (Smith-Palmer 1998) dell'olio essenziale di bergamotto, agrume che cresce solo in una stretta fascia costiera della provincia di Reggio Calabria.

In questo lavoro è stata valutata l'attività antibatterica dell'olio essenziale di bergamotto ottenuto come sottoprodotto della lavorazione dello stesso con il metodo "Peratoner" contro *Propionibacterium acnes*, agente etiologico coinvolto nella formazione dell'acne.

Mediante analisi Gas Cromatografiche con detector ad ionizzazione di fiamma (GC/ FID) sono stati identificati qualitativamente e quantitativamente tutti i componenti presenti nell'olio essenziale di bergamotto. Per le determinazioni della attività antimicrobica sono state effettuate le MICs e le MBC contro ceppi di *Propionibacterium acnes* sia ATCC che di isolamento clinico, utilizzando l'olio tale e quale e i singoli componenti riscontrati in maggiore percentuale, quali  $\alpha$ -terpineolo, terpinen-4-olo,  $\alpha$ -pinene . Poiché mediante GC/FID è stato possibile identificare anche gli enantiomeri dei singoli componenti sopra menzionati, di questi ultimi è stata valutata l'attività antibatterica sia delle forme racemiche che degli enantiomeri(+) e (-).

I risultati ottenuti sono stati buoni, soprattutto per gli enantiomeri terpinen-4-olo (+) e  $\alpha$ -terpineolo (+) con valori medi rispettivamente di 0,78  $\mu\text{g/ml}$  e 0,38  $\mu\text{g/ml}$ , rispetto a 98,6 $\mu\text{g/ml}$  del "peratoner" intero.

Questo studio suggerisce un utilizzo dell'olio essenziale di bergamotto nel trattamento dell'acne e dimostra che le miscele racemiche e soprattutto gli enantiomeri destrogiri hanno una azione più incisiva nella risoluzione di questa patologia.

## IL BLOCCO SELETTIVO DEL CCR5 CON DAPTA PREVIENE LA FORMAZIONE DI HIV-1 DNA E LA PRODUZIONE VIRALE NEI MACROFAGI ESPLICANDO EFFETTO NEUROPROTETTIVO.

Pollicita M.<sup>1</sup>, Pert C.B.<sup>2</sup>, Polianova M.<sup>2</sup>, Ruff M.<sup>2</sup>, Ranazzi A.<sup>1</sup>, Perno C.F.<sup>1</sup>, Aquaro S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dip. di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche Università di Roma "Tor Vergata",<sup>2</sup> Dip. di Fisiologia e Biofisica, Scuola di Medicina, Università di Georgetown, Washington, USA.

I monociti-macrofagi (M/M) costituiscono un reservoir di HIV-1. Il tropismo di HIV-1 è governato dalla distribuzione di proteine cellulari di superficie indispensabili al virus per infettare le cellule. I recettori per le chemochine CCR5 e CXCR4, sono i principali corecettori virali. I M/M possono essere produttivamente infettati da ceppi di HIV-1 che usano il CCR5, in aggiunta al CD4, per il legame con la gp120 (ceppi R5). CCR5 è quindi un bersaglio cruciale per l'inibizione dell'entrata di HIV-1 nei M/M. Il D-Ala-Peptide T-Amide (DAPTA), octapeptide disegnato sulla sequenza della V2 di HIV-1 gp120, agisce come inibitore selettivo dell'entrata, competendo con la gp120 al legame per il CCR5. DAPTA alla concentrazione di  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  nM inibisce l'espressione del CCR5 sulla membrana dei M/M del 53% e 74%, rispettivamente. L'attività antivirale del composto è stata studiata in M/M infettati in vitro con ceppi R5 di HIV-1. In presenza di DAPTA ( $10^{-7}$   $\mu\text{M}$ ) si osserva un'inibizione della replicazione virale >80% rispetto al controllo, misurata dal rilascio di p24 gag Ag nei supernatanti delle cellule infette (p: 0.001). Un'analisi di PCR in M/M infettati da HIV-1 ha rivelato che la produzione di DNA provirale in presenza di DAPTA, 1nM e 100 nM, risulta diminuita del 64% e del 70%, rispettivamente. Inoltre DAPTA è in grado di inibire l'apoptosi mediata da M/M infettati da HIV-1 in cellule neuronali che esprimono CCR5 (SK-N-SH). L'analisi al FACS di SK-N-SH dopo 5 giorni di esposizione a ceppi R5 di HIV-1 prodotti da M/M infetti ha rivelato che, in presenza di DAPTA ( $10^{-6}$  e  $10^{-7}$   $\mu\text{M}$ ), l'apoptosi cellulare viene inibita del 58% e del 56% rispettivamente. TAK-779 (antagonista selettivo di CCR5) inibisce invece l'apoptosi neuronale solo del 30% rispetto ai controlli. I risultati ottenuti aprono la strada ad un approccio terapeutico innovativo di combinazione con diversi inibitori dell'entrata che possono includere DAPTA, in quanto potente inibitore sia della replicazione di HIV-1 che del danno neuronale ad essa correlato.

## **SOSTANZE PRESENTI NEGLI ALIMENTI UTILI PER LA PREVENZIONE DELLA CARIE DENTALE: INIBIZIONE DELL'ADESIVITÀ DI STREPTOCOCCHI ORALI DA PARTE DEL CAFFÈ D'ORZO.**

R. Tarsi<sup>a</sup>, M. Daglia<sup>b</sup>, A. Papetti<sup>b</sup>, A. Baccaglia<sup>a</sup>, M. Cosmo<sup>a</sup>, C. Dacarro<sup>c</sup>, G. Gazzani<sup>b</sup> and C. Pruzzo<sup>d</sup>.

*Istituto di Microbiologia e Scienze Biomediche, Università Politecnica delle Marche<sup>a</sup>, Dipartimento di Chimica Farmaceutica<sup>b</sup> e Dipartimento di Farmacologia Sperimentale ed Applicata<sup>c</sup>, Università di Pavia, e Dipartimento di Biologia, Università di Genova<sup>d</sup>*

I cibi funzionali sono alimenti che, oltre ai valori nutrizionali di base, contengono ingredienti che sono in grado di recare benefici a chi li consuma. Il cavo orale e le prime vie respiratorie costituiscono un ambiente particolarmente idoneo all'attività dei cibi funzionali e l'adesività batterica alla superficie dei denti e alle cellule epiteliali può rappresentare un bersaglio privilegiato del potenziale anti-infettivo di alcuni alimenti. Studi recenti hanno dimostrato che il caffè è attivo nei confronti di *S. mutans* e che, a concentrazioni sub-inibenti, è in grado di inibire l'adesione di questo batterio a particelle di idrossiapatite (HA). Tale attività è dovuta principalmente a trigonellina, acido clorogenico e ad acido nicotinico oltre che a polifenoli condensati. Sulla base di questi risultati, abbiamo proseguito gli studi con l'obiettivo di analizzare l'effetto anti-adesivo di altre bevande. In particolare, abbiamo studiato il caffè d'orzo per il fatto che il suo uso va sempre più diffondendosi come sostitutivo del caffè. Nei saggi eseguiti abbiamo analizzato l'attività della bevanda *in toto* e, successivamente, di sue frazioni purificate. Sono stati analizzati gli effetti sull'adesività a particelle di HA trattate con saliva di *S. mutans* e di altri streptococchi del cavo orale (*S. sanguis*, *S. oralis*, *S. constellatus*, *S. intermedius*, *S. anginosus*, *S. salivarius*, *S. vestibularis*). I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che il caffè d'orzo *in toto*, usato alle stesse concentrazioni mediamente presenti nella bevanda, è in grado di inibire l'attacco di *S. mutans* (sia in presenza che in assenza di saccarosio) e degli altri streptococchi orali. L'effetto antiadesivo è stato osservato anche quando la bevanda veniva utilizzata per pretrattare l'HA. Nessun effetto è stato osservato sul distacco dei batteri già adesi. I risultati ottenuti con frazioni di caffè d'orzo hanno mostrato che, in particolare, la frazione con  $PM < 3500$  è più attiva nell'inibire l'adsorbimento saccarosio dipendente, mentre quella con  $PM > 3 \times 10^5$  è più attiva nei confronti dell'adsorbimento saccarosio indipendente. Questi studi fanno parte di un progetto di ricerca MIUR-PRIN2002.

## **ATTIVITÀ ANTITUMORALE DELLA SALMONELLA TYPHIMURIUM ATTENUATA SL7207, TRASFORMATA CON UN COSTRUTTO DI DNA RICOMBINANTE CODIFICANTE PER LA SUBUNITÀ CATALITICA TERT DELLA TELOMERASI UMANA (PLPC-HTERT), IN TOPI C57BL/6 PORTATORI DI MELANOMA B16.**

C. Romano Carratelli, R. Paolillo, A. Rizzo, S. Metafora<sup>1</sup>, F. Morelli<sup>1</sup>.

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

<sup>1</sup> *Istituto di Genetica e Biofisica "Adriano Buzzati – Traverso" CNR, Napoli;*

Il trasporto dei costrutti di DNA ricombinante a livello tumorale rappresenta uno dei principali problemi della terapia genica di questa malattia. A questo scopo sono stati usati vettori (virus difettivi, liposomi cationici, ecc.) e metodi fisici diversi (elettroporazione ecc.) con scarsi risultati. Recentemente è ricomparso un notevole interesse per l'uso di batteri anaerobi o anaerobi facoltativi (*Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Salmonella*) come veicoli di trasporto dei plasmidi ricombinanti per la loro capacità di accumularsi e moltiplicarsi nelle parti ipossiche del tumore. La *Salmonella*, in particolare, sembra essere particolarmente interessante per questi scopi.

Nel corso di questa ricerca sono stati usati ceppi attenuati di *Salmonella typhimurium* SL7207 come veicolo di un costrutto di DNA plasmidico ricombinante codificante per la subunità catalitica TERT della telomerasi umana (pLPC-hTERT) allo scopo di potenziarne l'attività anti-cancro.

I primi risultati da noi ottenuti dimostrano che topi C57BL/6, portatori di tumore B16(F10) e inoculati per via intraperitoneale (i.p.) con *S. typhimurium* SL7207 trasformata per elettroporazione con pLPC-hTERT ( $5 \times 10^6$  CFU/topo), presentano una diversa concentrazione batterica nei vari organi (milza e fegato) e nel tumore in rapporto al tempo di osservazione. Dopo 3 giorni dall'infezione, i batteri si accumulano negli organi studiati in concentrazioni simili a quelli trovati nel tumore; al 6° giorno il numero dei batteri aumenta in maniera rilevante nel tumore rispetto a quello trovato nella milza e nel fegato. La quantità di batteri nel tumore continua ad aumentare anche dopo 9 giorni dall'infezione e si presenta circa 1000 volte più alta rispetto a quella trovata nella milza e nel fegato. In conclusione, nei topi con tumore, 9 giorni dopo l'infezione con *Salmonella* contenente pLPC-hTERT si nota: 1) una maggiore concentrazione batterica nella massa tumorale, associata ad una risposta CTL maggiore di circa il 50% rispetto ai topi trattati con *Salmonella* attenuata non trasformata; 2) una leggera, significativa diminuzione in peso del tumore rispetto a quello presente in topi trapiantati e non infettati.

## EFFETTO DI ANTIBIOTICI SU CELLULE ENDOTELIALI UMANE ATTIVATE DA *CHLAMYDIA PNEUMONIAE*.

C. Romano Carratelli, R. Paolillo, A. Rizzo.

Dipartimento di Medicina Sperimentale-Sezione di Microbiologia e Microbiologia Clinica - Seconda Università degli Studi di Napoli.

La *Chlamydia pneumoniae* conosciuta come agente eziologico di infezioni dell'apparato respiratorio è stata coinvolta recentemente nella patogenesi multifattoriale di malattie infiammatorie croniche, quali l'artrite e l'aterosclerosi. Dal momento che l'endotelio svolge un ruolo centrale nella patogenesi dell'aterosclerosi, studi sull'interazione tra le cellule endoteliali e la *C. pneumoniae* potrebbero contribuire ad una maggiore comprensione del ruolo di questo microrganismo nella malattia. Il microrganismo si può moltiplicare "in vitro" nelle cellule endoteliali, nelle cellule muscolari lisce aortiche e nei macrofagi causando un'altra secrezione di citochine e chemochine correlata ad una aumentata progressione della lesione aterosclerotica. La dimostrata associazione tra *C. pneumoniae* e aterosclerosi in modelli murini, inoltre, porta all'ipotesi che la terapia antibiotica potrebbe influenzare l'andamento della malattia cardiovascolare, anche se studi condotti da vari Autori presentano risultati discordanti e difficili da interpretare. D'altra parte, è stato dimostrato che alcuni antibiotici, in aggiunta alla loro attività antimicrobica possono esercitare un'azione antibatterica indiretta dovuta al loro effetto antinfiammatorio.

In questo lavoro viene studiato l'effetto "in vitro" di tre antibiotici, claritromicina, doxiciclina e ofloxacina con meccanismi d'azione differenti, sulla vitalità di *C. pneumoniae* in cellule endoteliali umane (HUVEC), sui livelli di produzione di citochine TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12 e sul ruolo di queste nella resistenza all'infezione.

I risultati ottenuti dimostrano che le HUVEC trattate con ofloxacina (6-8mg/ $\mu$ l), con doxiciclina (5  $\mu$ g/ml-10 $\mu$ g/ml) o con claritromicina (1 $\mu$ g/ml-2 $\mu$ g/ml) immediatamente dopo l'infezione, presentano una diminuzione nel numero di IFU/ml correlate alla dose dell'antibiotico usato e al tempo di osservazione rispetto alle cellule infettate e non trattate.

Nelle HUVEC infettate con *C. pneumoniae* gli antibiotici determinano, inoltre, una diminuzione della produzione di TNF- $\alpha$  e IL-10 in rapporto alle concentrazioni usate e al tempo di osservazione ed una modificazione non significativa della concentrazione di IL-12 rispetto ai valori controllo nei tempi e nelle concentrazioni studiate.

In conclusione, gli antibiotici alle concentrazioni usate riducono ma non eliminano completamente il microrganismo ed esercitano un effetto immunomodulante potendo interferire con la sintesi delle citochine studiate.

## MODULAZIONE CELLULARE E ATTIVITA' ANTIVIRALE DELL' IFN $\lambda$ 2.

C. Serra\*, A. Biolchini\*, A. Mei\*, L. Carboni\*, S. Kotenko#, A. Dolei\*

\* Dip Scienze Biomediche Sez.di Microbiologia, Univ.Sassari, Italia; #Dip. Biochem Mol Biol, New Jersey Med School, Newark, USA.

Caterina Serra Phone: +39.079.228304

Fax: +39.079.212345

e-mail: [cserra@uniss.it](mailto:cserra@uniss.it)

Gli Interferon (IFN) lambda fanno parte di una nuova famiglia di citochine strutturalmente correlate agli IFN di tipo I e alla famiglia delle IL-10. Tuttavia sono membri di una distinta famiglia di INF, la prima nuova famiglia di IFN negli ultimi 20 anni. Come per gli altri IFN queste citochine, descritte recentemente, proteggono le cellule dall'infezione di virus citopatici (come VSV, ECMV, Sindbis, Dengue), e inducono l'espressione di HLA, suggerendo che questi mediatori contribuiscono alle difese antivirali e probabilmente esercitano diverse funzioni simili a quelle degli altri IFN. La famiglia dell'IFN $\lambda$  è costituita da tre membri denominati rispettivamente IFN $\lambda$ 1, IFN $\lambda$ 2 e IFN $\lambda$ 3 o IL-28A, IL-28B e IL-29, dai due gruppi che li hanno scoperti. Dal momento che l'IFN $\lambda$ 1 sembra essere particolarmente presente nelle cellule epiteliali, abbiamo studiato la sua attività antivirale nei confronti del virus dell'immunodeficienza acquisita (HIV) e dei geni cellulari HIV-correlati in cellule epiteliali HeLa-T4 e in cellule T C8166. È stato studiato il ceppo T-tropico HIV-P1 nell'infezione acuta di cellule C8166 e una variante epiteliale HIV-E nell'infezione cronica di cellule HeLa-T4, dopo pre-trattamento o co-trattamento con IFN $\lambda$ 2. Colture non infette sono state trattate in parallelo e i campioni sperimentali sono stati raccolti a vari tempi.

I risultati ottenuti indicano che il pre-trattamento con IFN $\lambda$ 1 aumenta il legame di HIV alle cellule, questo probabilmente è dovuto all'aumentata espressione dei co-recettori di HIV, CXCR4 e CCR5. Questo avviene sia nelle cellule T che in quelle epiteliali. Nelle stesse colture questo è associato ad un aumentato accumulo di HIV intracellulare, suggerendo che l'IFN $\lambda$ 1 influenza la maturazione di HIV piuttosto che la sua replicazione. Un altro nuovo effetto rilevato in cellule non infette è l'iper-espressione dei mediatori del rimodellamento osseo, OPG e RANKL.

Gli effetti dell'IFN $\lambda$ 1 nell'infezione di HIV e nelle funzioni cellulari aprono un nuovo campo di studio, le cui possibili implicazioni patogene e terapeutiche devono essere chiarite.

## IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI BATTERI MARINI CAPACI DI DEGRADAZIONE AEROBICA DI BENZENE, TOLUENE, CLORO-BENZENE E XILENE.

Antonella Deriu, Francesca Murineddu, Giovanna E. Felis, Leonardo A. Sechi, Stefania Zanetti.

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

Il lavoro presenta i dati preliminari riguardanti lo studio di microrganismi isolati in una area industriale della Sardegna nord-occidentale ad alto rischio di contaminazione da idrocarburi. L'identificazione dei microrganismi è stata effettuata con il metodo biochimico API20E e mediante amplificazione dei geni codificanti l'rRNA 16S e sequenziamento. I batteri isolati sono stati testati per la loro capacità di formare biofilm e per la capacità di sopravvivere e moltiplicarsi a diverse concentrazioni di benzene, toluene, cloro-benzene e xilene. I batteri che hanno dimostrato tolleranza a concentrazioni di benzene, toluene, cloro-benzene e xilene superiori al 20% v/v sono stati fatti crescere in terreno minerale minimo (MM 30 ml) con aggiunta di 60 µl dei suddetti composti (uno per volta) per valutarne la capacità di utilizzo come unica fonte di carbonio e confrontati con due ceppi di riferimento: il DSMZ 6900 *Sphingomonas yanoikuyae* ed il DSMZ 6413 *Pseudomonas putida*. Nel complesso sono stati saggiati 30 ceppi appartenenti ad 11 diversi generi, fra questi *Vibrio splendidus*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas fluorescens* *Halomonas variabilis* si sono dimostrati in grado di utilizzare tutti i composti, ma in particolare il benzene, come unica fonte di carbonio, inoltre tutti formavano biofilm su superfici abiotiche. La capacità dimostrata da questi microrganismi di sopravvivere ad elevate concentrazioni di benzene, toluene, cloro-benzene e xilene, non solo li candida ad essere ideali degradatori di PAHs (idrocarburi policiclici aromatici) ma anche alla possibilità di essere utilizzati come biosensori nel rilevamento di contaminanti.

## EFFETTO DEL TRANS-RESVERATROLO (T-RES) SULLE RISPOSTE IMMUNI MHC e CD1 RISTRETTE.

Tricarico M<sup>1</sup>, Fuggetta MP<sup>1</sup>, Lanzilli G<sup>1</sup>, Cottarelli A<sup>1</sup>, Prete SP<sup>2</sup>, Giuliani A<sup>1</sup>, Bonmassar L<sup>3</sup>, Bonmassar E<sup>1</sup>, Ravagnan G<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Ist. Neurobiologia e Medicina Molecolare, CNR, Roma; <sup>2</sup>Dip. Neuroscienze, Univ. Roma Tor Vergata; <sup>3</sup>IDI Roma; <sup>4</sup>Dip. Scienze Ambientali, Ca' Foscari, Univ. Venezia

Le molecole CD1 (a, b, c) la cui espressione è indotta da GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) sono dislocate sulla membrana di monociti/macrofagi umani. Il sistema CD1, simile a MHC Classe II, è deputato alla presentazione di antigeni non peptidici a cellule T a/b o g/d. Il T-RES (3,5,4-trihydroxystilbene), polifenolo presente nel vino rosso esercita numerose attività biologiche (inibizione delle cicloossigenasi, induzione di apoptosi CD95-dipendente, alterazioni del ciclo cellulare, modulazione di NF-kB, ecc) che suggeriscono un suo possibile ruolo sul sistema immune. È stato studiato quindi l'effetto del T-RES sulla immunità cellulo mediata MHC-ristretta e sull'espressione del CD1b, indispensabile per risposte T CD1-ristrette. La risposta MHC-ristretta è stata valutata utilizzando cellule mononucleate umane (MNC) allosensibilizzate in vitro con la leucemia MT-2 (indotta da HTLV-1) ed esposte a concentrazioni variabili di T-RES per 5 giorni. L'attività citotossica delle CTL ottenute è stata valutata mediante test di citolisi (Promega Cytotox 96) verso MT-2. Inoltre, l'influenza esercitata da T-RES su CD1b è stata studiata utilizzando cellule aderenti (AMNC), ottenute da MNC, coltivate in vitro per 3 giorni con GM-CSF (800 IU/ml), in presenza o meno di T-RES. I livelli di CD1b sono stati valutati al citofluorimetro, usando un anticorpo monoclonale anti-CD1b (Ancell). I risultati indicano che: (a) T-RES alle concentrazioni di 20 mg/ml e 1.25 mg/ml produce forte inibizione o non influenza, rispettivamente, la risposta allo-CTL MHC-ristretta verso MT-2; (b) a bassa concentrazione T-RES (0.15 mg/ml) aumenta nettamente la risposta immunitaria. Per quanto riguarda l'effetto del T-RES sul sistema CD1, i risultati indicano che: GM-CSF aumenta consistentemente CD1b. L'esposizione contemporanea delle AMNC a 1 mg/ml di T-RES non influenza i livelli di CD1b, mentre l'esposizione a 20 mg/ml riduce marcatamente i livelli di CD1b. In conclusione il T-RES aumenta, a basse concentrazioni, le risposte MHC-ristrette, mentre non influenza negativamente l'espressione di CD1b. Questo indica che basse concentrazioni di T-RES possono avere un ruolo positivo nelle infezioni, mentre alte concentrazioni sono altamente immunodepressive, sia verso risposte MHC-ristrette che CD1-ristrette. Finanziato dalla Prov. Auton. Trento

## HSV-1 INDUCE IL RECLUTAMENTO SELETTIVO DI NF- $\kappa$ B SU GENI VIRALI: EFFETTO SULLA REPLICAZIONE DI HIV.

Carla Amici<sup>1</sup>, Giuseppe Belardo<sup>1</sup>, Antonio Rossi<sup>2</sup>, Antonio Costanzo<sup>1</sup>, Stefania Ciafrè<sup>2</sup>, Massimo Levrero<sup>3</sup> e M.Gabriella Santoro<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Dipartimento di Biologia e Dermatologia, Università di Roma Tor Vergata; <sup>2</sup>Istituto di Neurobiologia e Medicina Molecolare CNR, Roma; <sup>3</sup>F. Cesalpino, Università di Roma La Sapienza.

NF- $\kappa$ B, un fattore nucleare coinvolto nella regolazione dell'infiammazione e della risposta immunitaria, ha un ruolo essenziale nell'attivazione trascrizionale di HIV (1). NF- $\kappa$ B è normalmente presente in un complesso citoplasmatico inattivo, legato a proteine inibitorie della famiglia I $\kappa$ B. Vari tipi di stimoli induttori di NF- $\kappa$ B attivano la chinasi IKK, il cui target è la proteina I $\kappa$ Ba. In seguito a fosforilazione I $\kappa$ Ba è degradata, permettendo la translocazione nucleare di NF- $\kappa$ B e l'induzione della trascrizione di un'ampia varietà di geni tra cui la stessa I $\kappa$ Ba che ha funzione di blocco del segnale di attivazione, sequestrando e inattivando NF- $\kappa$ B. Abbiamo recentemente dimostrato che in vari tipi di cellule il virus HSV-1 è un potente induttore della chinasi IKK e stimola l'attivazione di NF- $\kappa$ B a livelli comparabili a quelli ottenuti in seguito a trattamenti con citochine infiammatorie. A differenza degli stimoli infiammatori, in cellule infettate con HSV-1 il fattore trascrizionale rimane attivo in maniera persistente per oltre 24 ore (2). Abbiamo inoltre dimostrato che in cellule cronicamente infettate con HIV l'induzione della trasattivazione del provirus è direttamente dipendente dall'attivazione persistente di NF- $\kappa$ B indotta dalla super-infezione erpetica (3). Nel presente lavoro dimostriamo che l'attivazione persistente di NF- $\kappa$ B in cellule infettate con HSV-1 è dovuta ad un'alterazione del sistema di autoregolazione del fattore, causata dal mancato reclutamento di NF- $\kappa$ B sul promotore di I $\kappa$ Ba con conseguente blocco selettivo della trascrizione della proteina inibitoria. L'analisi ChIP ha inoltre evidenziato che NF- $\kappa$ B viene reclutato sia sul promotore del gene precoce-immediato ICPO di HSV-1 che sulla regione LTR di HIV, attivando selettivamente la trascrizione dei geni virali e inducendo la riattivazione di HIV.

Santoro MG, Rossi A and Amici C. (2003) NF- $\kappa$ B and virus replication: who controls whom. *EMBO J.*, 22: 2552-2560.

Amici C, Belardo G, Rossi A and Santoro MG. (2001) Activation of I $\kappa$ B kinase by Herpes Simplex virus type 1. A novel target for anti-herpetic therapy. *J. Biol. Chem.*, 276: 28759-28766.

Amici C, Belardo G, Bernasconi D and Santoro MG. (2004) Inhibition of herpesvirus-induced HIV-1 replication by cyclopentenone prostaglandins: role of IKK kinase. *AIDS*, 18: 1271-1280.

## VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIFUNGINA DI OLI ESSENZIALI IN LIQUIDO ED IN FASE DI VAPORE NEI CONFRONTI DI *CANDIDA ALBICANS* E ALTRI LIEVITI

V. Tullio, A. Nostro<sup>o</sup>, N. Mandras, J. Roana, M.A. Cannatelli<sup>o</sup>, F. Procopio<sup>o</sup>,  
A. M. Cuffini, G. Crisafi<sup>o</sup>, N.A. Carlone

Dipartimento di Sanità Pubblica e Microbiologia, Università di Torino

<sup>o</sup> Dipartimento Farmaco-Biologico, Facoltà di Farmacia,

Università degli Studi di Messina

Sulla base dei dati riportati precedentemente, sull'attività inibente di sette oli essenziali (timo, melissa, garofano, finocchio, pino, salvia e lavanda) nei confronti di miceti filamentosi, lo scopo di questo studio è stato quello di estendere la ricerca e verificare le proprietà antifungine degli oli essenziali su ceppi di *Candida albicans* e altri lieviti patogeni. Il valore delle MIC degli oli essenziali è stato determinato sia in terreno liquido, secondo il metodo proposto dall'NCCLS, sia in terreno solido, con il metodo di valutazione dell'efficacia in fase di vapore. Ulteriori prove sperimentali sono state allestite per stabilire l'azione antifungina esercitata da alcuni tra i principali componenti del timo (carvacrolo, timolo), della lavanda (linalolo, linalilacetato) e del garofano (eugenolo). I risultati preliminari ottenuti sottolineano un'ottima sensibilità dei ceppi saggiati alla maggior parte degli oli soprattutto in fase di vapore, in particolare al timo e alla lavanda e ai loro componenti. Il garofano ha mostrato debole attività nei confronti dei lieviti saggiati sia in liquido che in fase di vapore, mentre il pino è risultato l'unico olio ad avere dimostrato una discreta attività in liquido. Probabilmente l'effetto diretto dei vapori combinato con l'assorbimento su agar potenzia l'attività degli oli essenziali.

Studi sono attualmente in corso per valutare l'attività antifungina dei singoli componenti dei diversi oli essenziali nell'ottica dello sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

## **AVRA, UN EFFETTORE PROTEICO DI SALMONELLA, RIDUCE L'INVASIONE BATTERICA E LA RISPOSTA INFIAMMATORIA INTESTINALE.**

Donatella Bacciu, Salvatore Rubino, Sergio Uzzau.

*Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari*

*Salmonella enterica* possiede due sistemi di secrezione di tipo terzo (TTSS-1 e TTSS-2) codificati, rispettivamente, dalle isole di patogenicità SPI-1 e SPI-2. TTSS-1 secreta numerosi effettori proteici, traslocandoli nel citoplasma della cellula ospite. Alcuni, come SipA, SopA, SopB, SopD, SopE e SopE2, sono stati caratterizzati e contribuiscono all'invasione della mucosa intestinale, favorendo la genesi del processo infiammatorio intestinale. Altri effettori secreti dal TTSS-1, meno caratterizzati, sono variamente rappresentati nei diversi sierotipi di *S. enterica* ed il loro ruolo nella patogenicità di *Salmonella* è, talvolta, solo ipotizzabile sulla base di predizioni, *in silico*, della loro struttura e funzione. In questo studio abbiamo analizzato uno di questi fattori, AvrA, codificato da SPI-1 in numerosi sierotipi, incluso *S. enterica* Typhimurium. In modelli sperimentali in vitro, AvrA blocca l'attivazione del fattore di attivazione trascrizionale eucariotico NF-κB. È ipotizzabile, pertanto, che *Salmonella* controlli la reazione infiammatoria mediante la produzione e la secrezione di AvrA. Mediante *epitope tagging*, abbiamo analizzato i livelli di produzione di AvrA in due sierotipi di *S. enterica*: il sierotipo Typhimurium, che dà luogo ad una salmonellosi caratterizzata da gastroenterite, ed il sierotipo Abortusovis, che non dà luogo a diarrea, né a lesioni istopatologiche di tipo infiammatorio. Inoltre, sono stati costruiti mutanti *avrA* per ciascun sierotipo e sono stati analizzati: i) l'efficienza di invasione in modelli di infezione in vitro; ii) il loro effetto sul processo di attivazione di NF-κB e di caspasi-3 nelle cellule infettate. Nel complesso, i nostri risultati dimostrano che *avrA* viene espresso a livelli molto superiori (>100 volte) nel sierotipo non infiammatorio Abortusovis, rispetto al sierotipo pro-infiammatorio Typhimurium. In coerenza con questo dato, i tests di invasione epiteliale con il mutante *avrA* del sierotipo Typhimurium non mostrano alcun fenotipo, mentre il mutante *avrA* del sierotipo Abortusovis invade le cellule epiteliali con un'efficienza superiore (oltre 50 volte) rispetto al ceppo selvaggio. In conclusione, i dati suggeriscono che il controllo dell'infiammazione intestinale da parte di *Salmonella* dipende da fattori proteici, quali AvrA, che agiscono sia direttamente sull'attivazione di NF-κB, che indirettamente sull'efficienza di invasione e quindi di trasferimento dei batteri alla lamina propria dove avviene la stimolazione dei recettori TLR.

## **DOMINI FUSOGENICI DELLA GLICOPROTEINA gH DA HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 1**

Mariateresa Vitiello<sup>1,3</sup>, Annarita Falanga<sup>1</sup>, Helena Browne<sup>4</sup>, Carlo Pedone<sup>2,3</sup>, Stefania Galdiero<sup>2,3</sup>, Massimiliano Galdiero<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Experimental Medicine - II University of Naples, Italy; <sup>2</sup>Department of Biological Science & <sup>3</sup>CIRPEB - University of Naples "Federico II", Italy; <sup>4</sup>Division of Virology, Department of Pathology - University of Cambridge, UK.

L'entrata dell' Herpes simplex virus 1 (HSV-1) nella cellula ospite e la fusione delle due membrane richiede l'azione di quattro glicoproteine virali (gB, gD, gH e gL). La glicoproteina gH presenta caratteristiche tipiche delle proteine di fusione; il suo ectodominio è stato analizzato in dettaglio con tecniche di bioinformatica al fine di identificare domini della proteina capaci di interagire fortemente con le membrane ed indurre la fusione. L'analisi dell'idrofobicità all'interfaccia calcolata con la scala di Wimley e White ha evidenziato sei picchi; peptidi sintetici corrispondenti a quattro di questi picchi sono in grado di indurre la fusione di liposomi. Esperimenti con miscele equimolari di peptidi dell'HSV hanno indicato che differenti regioni fusogeniche hanno un'azione sinergica, infatti, la percentuale di fusione ottenuta con la combinazione di quattro peptidi è più alta della somma delle percentuali di fusione dei singoli peptidi. La caratterizzazione funzionale e strutturale di questi peptidi suggerisce che la glicoproteina gH presenta diversi domini interni che partecipano alla fusione. Questi dati sono stati ulteriormente supportati da studi diicroismo circolare e da misure di fluorescenza.

## OPTIMIZATION BIOMOLECULAR METHODS TO IDENTIFY BACTERIAL COMMUNITIES ON CULTURAL HERITAGE

1Meloscia A., 2Orsini M., 1Lustrato G., 1 Ranalli G.

<sup>1</sup> DISTAAM, Università degli Studi del Molise via De Sanctis, 86100 Campobasso (I), <sup>2</sup> Istituto di Igiene Università Cattolica del Sacro Cuore 00168 Roma (I).

Correspondence to: Giancarlo Ranalli, DISTAAM, Università degli Studi del Molise via De Sanctis, 86100 Campobasso Italy. Tel. +39-0874-404604 (fax -652). E-mail: [ranalli@unimol.it](mailto:ranalli@unimol.it)

Microbial investigations carried out in the past were based on traditional cultivation studies using selective plating techniques. The main limitation of this method is the bias towards identifying culturable microorganisms: these techniques recover less than 1% of the total microorganisms present in environmental samples (Amann *et al.* 1995). The results obtained from microbial investigations based on cultivation strategies could lead to serious errors of interpretation in terms of reflecting the microbial diversity. The correct conservation and restoration of cultural heritage, it based on identification of the complete microbial diversity present on art objects (Ranalli *et al.* 2005).

Recent applications of molecular biology techniques to microbial ecology provide cultivation-independent options for analysis of complex microbial communities (Amann *et al.* 1995).

Several approaches have been used to extract genomic DNA, including commercially available kits for the extraction of microbial DNA. The quality and purity of the extracted nucleic acid pool is vital for successful PCR amplification of target genomic DNA/RNA.

The objective of the research discussed in the present paper was optimization of biomolecular methods to identify bacterial communities in cultural heritage by different methods extraction of DNA.

The results, deriving from comparison with several approaches, have been expressed in terms of DNA yield, purity of the extracted nucleic acids, times processing, PCR amplifiability.

From the viewpoint of practical application, the overall results appear of great interest because has permitted to cope with the problems related of PCR inhibitors. In fact, GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep and TRIReagent® BioChemika kits have been provided a rapid and simplified procedure for genomic DNA extraction directly from environmental samples.

## L'ATTIVITA' ATP-DIFOSFOIDROLASICA DELL'APIRASI NON E' IMPORTANTE PER LA LOCALIZZAZIONE POLARE DI IcsA SULLA SUPERFICIE DI *S. flexneri*.

F. Del Chierico<sup>1</sup>, S. Sarli<sup>2</sup>, F. Berlutti<sup>2</sup>, A. Petrucca<sup>3</sup>, P. Cipriani<sup>3</sup> e M. Nicoletti<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche, Univ. "G. D'Annunzio" di Chieti; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica e

<sup>3</sup>Laboratorio di Microbiologia Clinica, II Facoltà di Medicina, Ospedale "Sant'Andrea", Univ. "La Sapienza" di Roma.

I batteri enteroinvasivi invadono e si moltiplicano all'interno di differenti cellule dell'ospite. Questo processo è indotto mediante elaborazione e secrezione di una serie di effettori che vengono traslocati, attraverso il sistema di secrezione di tipo III (SSTT), all'interno della cellula ospite al fine di modificare a proprio vantaggio la fisiologia cellulare. In condizione di attivazione della secrezione, *Shigella flexneri* up-regola l'espressione di numerosi geni di virulenza, tra cui *ospB* e *phoN2*. Questi due geni, localizzati sul plasmide di virulenza, costituiscono un'unità bicistonica e codificano rispettivamente, una proteina secreta dal SSTT dall'attività sconosciuta (OspB) ed un apirasi (ATP difosfoidrolasi), una proteina periplasmica in grado di idrolizzare i dNTP in dNDP e questi in dNMP.

Al fine di valutare il ruolo di *phoN2* nel meccanismo di patogenicità di *S. flexneri* abbiamo introdotto una delezione dell'intero gene nel ceppo di *S. flexneri* M90T e valutato il mutante per il suo profilo di virulenza. I risultati ottenuti dimostrano che l'inattivazione di *phoN2* altera significativamente la capacità di M90T di diffondersi all'interno della cellula ospite ed a cellule adiacenti. Il mutante analizzato forma "placche piccole" su monostrati di cellule HeLa e Caco-2 e tale alterazione è dovuta ad una alterata localizzazione di IcsA che è presente su tutta la superficie batterica, invece che localizzata ad un solo polo del batterio. Tale alterata localizzazione induce anche una alterata polimerizzazione di code di actina.

Per caratterizzare il meccanismo di azione dell'apirasi, abbiamo determinato se l'attività ATP-difosfoidrolasica fosse necessaria per la localizzazione polare di IcsA. A tal fine abbiamo complementato il nostro ceppo con un mutante del gene *phoN2*, ottenuto per mutagenesi random, che presenta una mutazione puntiforme (A160T) localizzata all'interno del putativo sito catalitico dell'enzima che determina l'inattivazione dell'attività enzimatica.

L'introduzione dell'apirasi inattiva nel nostro mutante (clonata in un vettore plasmidico) ripristina la capacità di formare placche "wild-type", indicando che l'attività ATP-difosfoidrolasica dell'apirasi non è necessaria per la localizzazione polare di IcsA sulla superficie batterica.

## **MEF (I), UNA NUOVA SOTTOCLASSE DEL GENE MEF IN PNEUMOCOCCHI CON ERITROMICINO-RESISTENZA DI TIPO M.**

I. Cochetti, M. Vecchi, M. Mingoia, E. Tili, A. Manzin, P.E. Varaldo, M.P. Montanari.

*Istituto di Microbiologia e Scienze Biomediche, Università Politecnica delle Marche, Ancona.*

Negli streptococchi, la resistenza ai macrolidi può dipendere, oltre che da meccanismi di modificazione del bersaglio, da un sistema di efflusso attivo, che produce una resistenza solitamente a basso livello nei confronti dei soli macrolidi a 14 e 15 atomi di carbonio (fenotipo M). La pompa d'efflusso è codificata dal gene *mef*, di cui sono attualmente riconosciute due sottoclassi: *mef(A)*, identificata per la prima volta in *Streptococcus pyogenes*, e *mef(E)*, identificata per la prima volta in *Streptococcus pneumoniae*. Le due varianti hanno un'omologia del 90% e possono essere differenziate mediante analisi PCR-RFLP. Una qualche variabilità è stata riportata per *mef(A)*, mentre le sequenze *mef(E)* finora descritte sono omologhe al 100%. Ambedue le varianti *mef* possono essere presenti in ceppi di *S. pneumoniae*, in cui però sono veicolate da due diversi elementi genetici non coniugativi: *mef(A)* dal trasposone Tn1207.1, che contiene 8 ORF di cui *mef(A)* è la quarta, e *mef(E)* dall'elemento mega (*macrolide efflux genetic assembly*), che contiene 5 ORF di cui *mef(E)* è la prima e presenta ampie omologie con le ultime 5 ORF di Tn1207.1. A valle del gene *mef*, sia Tn1207.1 che mega presentano una ORF, denominata *msr(D)*, che codifica un'altra pompa d'efflusso, è co-trascritta insieme a *mef*, e si ritiene contribuisca in modo significativo a determinare la resistenza di tipo M. In una nostra recente indagine sul gene *mef* in pneumococchi di origine clinica, mentre la gran parte dei ceppi esaminati presentavano i geni *mef(A)* o *mef(E)* regolarmente inseriti nei rispettivi elementi Tn1207.1 o mega, due ceppi epidemiologicamente indipendenti presentavano un gene *mef* identificato come *mef(I)* mediante analisi PCR-RFLP, non associato, almeno coi primer comunemente utilizzati, a nessuna delle altre ORF caratteristiche dell'elemento mega. La sequenza dell'amplificato di 1743 bp contenente il gene *mef* era identica nei due ceppi, ma non si allineava con il gene *mef(E)* di mega (93,6% di omologia) e mostrava un'omologia del 91,4% con il gene *mef(A)* di Tn1207.1. Questo gene è stato considerato una nuova sottoclasse del gene *mef*, cui è stata data la denominazione *mef(I)*. Più estesi studi di sequenziamento sono in corso per chiarire se la nuova variante *mef* è associata a un elemento genetico nuovo (o difettivo), per mettere a punto un nuovo metodo di analisi PCR-RFLP capace di differenziare le tre varianti *mef*, e per valutare il significato dell'assenza di evidenza PCR del gene *msr(D)*, non potendosi escludere la presenza di varianti *msr* non rilevabili coi primer abituali.

## **VALUTAZIONE DEL SISTEMA VITEK2 PER LA RILEVAZIONE DELLE $\beta$ -LATTAMASI A SPETTRO ESTESO IN *ESCHERICHIA COLI*, *KLEBSIELLA SPP* E *PROTEUS MIRABILIS*.**

Teresa Spanu\*, Tiziana D'Inzeo, Maurizio Sanguinetti, Barbara Fiori, Giovanni Pecorini, Fiammetta Leone, Brunella Posteraro, Rosaria Santangelo, Giovanni Fadda

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

L'inadeguatezza della terapia antimicrobica empirica è un significativo fattore di rischio per la mortalità associata con le infezioni sistemiche causate dai ceppi di *Enterobacteriaceae* produttori di  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL). Una rapida e affidabile rilevazione delle ESBL è importante per instaurare efficaci terapie. Obiettivo di questo studio è stata la valutazione del "ESBL test" del sistema automatico VITEK2 (bioMérieux, Inc, Hazelwood, Mo.) che utilizza cefotaxime, ceftazidime e cefepime con e senza acido clavulanico per la rilevazione delle ESBL. Sono stati saggiati 705 ceppi di *Escherichia coli*, *Klebsiella spp* e *Proteus mirabilis*, isolati negli anni 1999-2003 nel Laboratorio di Microbiologia del Policlinico Universitario "A. Gemelli" dalle emocolture di pazienti con batteriemia. La prevalenza della produzione di ESBL era pari al 5,9% (2/34) in *K. oxytoca*, al 13,8% (67/484) in *E. coli*, al 32,6% (48/147) in *K. pneumoniae*, e al 52,5% (21/40) in *P. mirabilis*. Nello studio sono stati inclusi anche 204 ceppi di collezione con meccanismi di resistenza ai  $\beta$ -lattamici precedentemente caratterizzati. I risultati ottenuti con il sistema VITEK2 sono stati confrontati con i risultati dei metodi molecolari. In 276 dei 280 stipiti ESBL-positivi il sistema VITEK2 ha correttamente identificato la produzione di ESBL (sensibilità: 98,6%), mentre per 626 dei 629 ceppi che non producevano ESBL il sistema ha fornito un risultato negativo (specificità: 99,5%). Il tempo medio per la rilevazione delle ESBL con il sistema VITEK2 è risultato pari a 8,2 ore (range: 6,25-15,7 ore, mediana: 7,5 ore). I risultati di questo studio suggeriscono che l'"ESBL test" del sistema VITEK2 rileva accuratamente e rapidamente la produzione di ESBL nei ceppi di responsabilità di batteriemie.

## ATTIVITÀ ANTIMICOTICA “IN VITRO” DI TRE OLI DI BERGAMOTTO NEI CONFRONTI DI DERMATOFITI APPARTENENTI AI GENERI *TRICHOPHYTON*, *EPIDERMOPHYTON* E *MICROSPORUM*

L. Romano, M. Sanguinetti, B. Posteraro, F. Battaglia\*, L. Masucci, R. Torelli, T. Lopizzo, S. Zanetti<sup>o</sup> e G. Fadda  
*Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del S. Cuore, Unità di Ginecologia e Ostetricia, Ospedale S. Filippo Neri, Roma, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari, Sassari.*

**Scopo della ricerca.** Valutare l'azione antimicotica in termini di minima concentrazione inibente (MIC) e di minima concentrazione fungicida (MFC) dell'essenza naturale, dell'estratto defurocumarinizzato e dell'estratto distillato di bergamotto nei confronti di alcuni ceppi fungini appartenenti alle specie di dermatofiti di più frequente isolamento clinico.

**Materiali e metodi.** I ceppi fungini (N=92) inclusi nello studio sono stati isolati presso il Policlinico Universitario “A. Gemelli” di Roma da pazienti affetti da dermatofizie, ed erano così distribuiti: *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* (n=20), *T. tonsurans* (n=2), *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* (n=15), *T. rubrum* (n=18), *Epidermophyton floccosum* (n=12), *Microsporum gypseum* (n=1) e *M. canis* (n=24). I test sono stati condotti con il metodo della microdiluzione in brodo, secondo il protocollo NCCLS M38-A descritto per i saggi di sensibilità dei funghi filamentosi agli agenti antifungini; per ciascuno dei tre oli sono state saggiate concentrazioni scalari dal 10% allo 0,002% (v/v). Si è anche valutata la sensibilità di ciascuno dei ceppi in esame ai più comuni farmaci antimicotici.

**Risultati e conclusioni.** Sul totale degli isolati, alle tre letture effettuate a 72, 96 e 120 ore dall'inoculo, per l'essenza naturale di bergamotto si osservava una MIC<sub>90</sub> pari allo 0,625% (v/v). Sia per l'estratto defurocumarinizzato che per l'estratto distillato, in ciascuno degli stessi intervalli di lettura, tale valore risultava più basso di una diluizione e quindi pari allo 0,312% (v/v). Tali valori di MIC<sub>90</sub> corrispondevano a quelli di MFC per ciascuno dei tre oli. In alcuni casi, alla buona sensibilità dei ceppi in esame agli oli di bergamotto, si associava una ridotta sensibilità ad alcuni dei tradizionali farmaci antimicotici. Dai risultati ottenuti si evidenzia l'efficacia “in vitro” dell'essenza naturale di bergamotto, ma soprattutto dei derivati defurocumarinizzato e distillato nei confronti dei ceppi di funghi filamentosi studiati. Tali risultati sono concordanti con quelli da noi precedentemente ottenuti nei confronti di diverse specie di lieviti di isolamento clinico.

## CLONAGGIO E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI UN ANTICORPO MONOCLONALE DIRETTO CONTRO LA ONCOPROTEINA E7 DELL'HPV-18

F. Bugli, R. Graffeo, M.Sali, R. Torelli, S. Marchetti, A. Siddu, R. Santangelo, P. Cattani e G. Fadda  
*Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*

Lo Human Papilloma Virus (HPV) appartiene alla famiglia *Papovaviridae* ed è un virus epiteliotropo a DNA, la cui replicazione avviene con modalità differenti nei diversi strati cellulari dell'epidermide. Il genoma dell'HPV comprende delle regioni che codificano per proteine precoci (E, da Early), e regioni che codificano per proteine tardive (L, da Late). Tra le proteine precoci sono state largamente studiate le proteine E6 ed E7 che presentano un differente potenziale oncogeno. Tale potere oncogeno è significativamente associato ad alcuni genotipi di HPV denominati per questo ad “alto rischio”.

A livello genitale l'HPV è responsabile di patologie benigne (condilomi, papillomi) ed è significativamente associato a lesioni maligne quali il carcinoma a cellule squamose della cervice uterina. Numerosi studi hanno definitivamente stabilito che l'HPV costituisce un fattore necessario, anche se non sufficiente, per lo sviluppo del carcinoma cervicale. Oltre i due terzi dei carcinomi cervicali sono infatti associati alla presenza di HPV di genotipo 16 o 18.

La trasformazione maligna della cellula infettata dall'HPV dipende principalmente dall'espressione incontrollata delle proteine oncogene E6 ed E7 dell'HPV che a loro volta interagiscono con proteine regolatrici cellulari (p53, pRB), traducendosi in una perdita del controllo della proliferazione delle cellule epiteliali.

Scopo di questo lavoro è stato quello di produrre degli anticorpi monoclonali ricombinanti diretti verso la oncoproteina virale E7.

Il gene della proteina E7 dell'HPV 18 è stato quindi clonato in un vettore di espressione procariotico. La proteina ricombinante E7 è stata quindi espressa unitamente ad un tag di istidine che ne ha consentito la purificazione. Topi Balb/c sono stati immunizzati con la proteina ricombinante E7/HPV-18 ed in seguito sacrificati per la costruzione di una library anticorpale di esposizione fagica.

Questo studio descrive in dettaglio il clonaggio e la caratterizzazione molecolare di un anticorpo monoclonale diretto contro la proteina E7 dell'HPV 18 derivante da tale library di phage display.

L'anticorpo monoclonale selezionato è in grado di riconoscere la proteina virale E7 in linee cellulari trasformate con l'HPV e potrebbe rappresentare uno strumento validissimo, nella diagnostica clinica, per l'identificazione rapida dell'espressione genica virale coinvolta nel processo di trasformazione del fenotipo maligno.

## THE GENETIC ELEMENT Tn1207.3 CARRYING MACROLIDE EFFLUX GENES IN STREPTOCOCCI

Iannelli F<sup>1</sup>, Orienti C.<sup>1</sup>, Santagati M.<sup>2</sup>, Oggioni M.R.<sup>1</sup>, Stefani S.<sup>2</sup>, Pozzi G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, University of Siena, Italy

<sup>2</sup>Department of Microbiology, University of Catania, Italy

Type M resistance to macrolides in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* is associated to *mef* genes. In *S. pyogenes* *mef(A)* is carried by the genetic element Tn1207.3 that is 52,491 bp in length. Tn1207.3, integrates at a single specific site (*comEC*) in the bacterial chromosome, contains 58 ORFs of which 2 genes, *mef(A)*-*msr(D)*, are involved in macrolide efflux, 3 ORFs encoding for putative recombinases. We transferred Tn1207.3 by conjugation in *S. pneumoniae* recipient mutants and its integration sites in pneumococcal chromosome were characterized. In *S. pneumoniae* the preferential insertion site of Tn1207.3 is located in *celB*, a *comEC* homolog, and its integration impairs competence for genetic transformation. A pneumococcal strain carrying Tn1207.3 integrated elsewhere and then competent for transformation was developed and used as recipient to generate single or double deletion mutants in the ORFs for recombinases. All mutants were assayed with MIC determinations and mating experiments.

## N-CAPPING BOX E HYDROPHOBIC STAPLE MOTIF IN *Proteus mirabilis* GST. CARATTERIZZAZIONE DI DUE MOTIVI RICORRENTI NELLA STRUTTURA DELLE GLUTATIONE TRANSFERASI

Nerino Allocati, Michele Masulli, Carmine Di Ilio

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università "G. d'Annunzio", Chieti

*Proteus mirabilis* glutatione transferasi B1-1 (PmGSTB1-1) [1] è un enzima batterico appartenente alla classe Beta della famiglia delle GST un gruppo di proteine coinvolte nella detossificazione cellulare sia negli eucarioti che nei procarioti. PmGSTB1-1 è caratterizzato dalla presenza di una molecola di glutatione legata alla cisteina 10 [2,3]. Oltre all'attività coniugativa tipica delle GST, PmGSTB1-1 ha attività redox [4]. E' stato dimostrato che questa proteina interviene nella protezione verso lo stress ossidativo generato dal perossido d'idrogeno [5]. Inoltre, PmGSTB1-1 è capace di legare, *in vitro* e *in vivo*, diverse classi di antibiotici suggerendo un suo coinvolgimento nella detossificazione dei farmaci antimicrobici [5,6].

In PmGSTB1-1 sono presenti due motivi ricorrenti in tutte le GST citosoliche, un N-capping box (un doppio legame idrogeno tra l'acido aspartico 155 e la treonina 152) e un hydrophobic staple motif (interazioni idrofobiche tra i residui fenilalanina 151 e alanina 156). Infatti, dall'allineamento di sequenza ottenuto tra PmGSTB1-1 e le altre GST delle varie classi citosoliche è stato evidenziato che questi due motivi sono altamente conservati. Per determinare il loro contributo su PmGSTB1-1 sono stati preparati diversi mutanti mediante mutagenesi sito-specifica e sono stati esaminati gli effetti delle sostituzioni sulla proteina attraverso l'analisi cinetica e strutturale. Tutti i mutanti sono risultati essere termosensibili per cui si è resa necessaria la coltivazione dei diversi ceppi batterici alla temperatura di 25°C. I mutanti sono stati purificati come precedentemente descritto [7].

I risultati ottenuti dimostrano che le mutazioni dei residui studiati hanno un effetto destabilizzante sull'intera proteina. Inoltre, sebbene questi residui siano lontani dal sito attivo la loro sostituzione influenza la catalisi dell'enzima batterico.

## **CORRELAZIONE TRA IL BACKGROUND GENETICO E LE VARIANTI DI SCCMEC DEI MAGGIORI CLONI DI STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILLINO-RESISTENTI (MRSA), CIRCOLANTI IN ITALIA.**

Campanile Floriana, Borbone Sonia, Bongiorno Dafne, Cafiso Viviana, Cascone Carmela, Mezzatesta Marilina, Santagati Maria e Stefani Stefania.

*Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Ginecologiche, Università di Catania.*

Negli Stafilococchi, la base genetica della meticillino-resistenza – il gene *mecA* – è associata all'acquisizione della cassetta cromosomica SCCmec (Staphylococcal Chromosomal Cassette). La localizzazione di *mec* in cassette mobili rimette in discussione la presunta origine dei cloni meticillino-resistenti da un unico progenitore; infatti, alla marcata clonalità degli MRSA si contrappone la variabilità dell'elemento SCCmec, facendo ipotizzare un trasferimento orizzontale realizzatosi all'origine tra diverse linee evolutive ancestrali, che poi si sono diffuse clonalmente.

Studi condotti precedentemente nel nostro laboratorio, hanno rivelato la diffusione di cinque maggiori cloni: il clone Arcaico, progenitore del clone Iberico, sensibile ai macrolidi; i più noti cloni multiresistenti Iberico e Brasiliano, e due nuovi cloni, classificati come Italiano (sensibile a tetraciclina e rifampicina) e Romano (sensibile a clindamicina ed eritromicina).

Il nostro obiettivo è stato quello di riesaminare il background genetico di un campione selezionato di MRSA, mediante Multi-Locus-Sequence Typing (MLST) - tecnica basata sul sequenziamento di sette geni house-keeping – e di correlarlo con i diversi elementi SCCmec (SCCmec I-IV), caratterizzati mediante multiplex PCR, al fine di intraprendere uno studio sulle correlazioni genetiche e predire il genotipo ancestrale dal quale discendono attualmente i cloni di MRSA maggiormente diffusi in Italia.

Attraverso tale correlazione è emerso che gli MRSA appartenenti ai cloni Arcaico (ST247-I), Iberico (ST247-IA), Brasiliano (ST239-IIIa) e Romano (ST247-I o IA), derivano dallo stesso progenitore, poiché discendono dalla stessa linea genetica (ST8); tuttavia, la loro associazione con diversi elementi SCCmec, rappresenta un esempio di evoluzione microbica, per la loro abilità ad acquisire determinanti di resistenza all'interno di un elemento genetico stabile (SCCmec) che agisce come "isola di antibiotico-resistenza". Invece, il background genetico del clone Italiano (ST228-I), completamente diverso e correlato al clone South Germany, rappresenta una variante allelica (ST5) del clone NY/Japan e di ceppi di *S.aureus* con diverse caratteristiche (MSSA, MRSA e GISA); parallelamente, la sua associazione con la variante più antica della cassetta SCCmec I, conferma l'ipotesi del trasferimento orizzontale del gene *mecA* tra diverse linee ancestrali, nonché l'immediato successo di questo clone.

## **SEQUENZIAMENTO DEL CLUSTER GENICO CODIFICANTE IL COMPLESSO DELLA TOSSINA BOTULINICA DI TIPO A2**

Antonella Maugliani, Francesca Floridi, Giovanna Franciosa, Paolo Aureli  
*Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari  
Istituto Superiore della Sanità, Roma*

La tossina botulinica di tipo A viene sintetizzata da *Clostridium botulinum* in complesso con proteine accessorie, diverse a seconda del ceppo produttore. I complessi di tipo A1 comprendono proteine emo-agglutinanti, i complessi di tipo A2 sono privi di emo-agglutinine: inoltre, le tossine che fanno parte di questi complessi differiscono l'una dall'altra nel 10% circa della sequenza aminoacidica. Queste differenze sono determinate rispettivamente dalla composizione genica dei cluster che codificano i complessi A1 ed A2, e dalla sequenza del gene della tossina botulinica di tipo A dei complessi. Sulla base di risultati ottenuti mediante esperimenti di PCR per l'identificazione dei geni delle proteine accessorie, e di analisi di restrizione dei geni per la tossina botulinica, abbiamo recentemente dimostrato che i ceppi di *C. botulinum* tipo A isolati in Italia sono tutti A2. Al fine di confermare tali risultati, abbiamo qui determinato la sequenza nucleotidica del cluster genico codificante il complesso della tossina botulinica di un ceppo di *C. botulinum* tipo A isolato in Italia durante un episodio di botulismo dovuto al consumo di mascarpone contaminato. Approssimativamente, un frammento di circa 10 kilobasi di DNA genomico del ceppo è stato amplificato mediante PCR e purificato: successivamente, questo DNA è stato utilizzato come template in tutte le reazioni PCR da sottoporre a sequenziamento. Sei ORF sono stati individuati nella sequenza ottenuta: due (ORFX1 e ORFX2) codificano proteine di 224 e 142 aminoacidi, rispettivamente, la cui funzione è ignota. I rimanenti 4 ORF codificano la tossina botulinica (1296 aminoacidi); il componente non tossico e non emoagglutinante (NTNH) presente in tutti i complessi (1193 aminoacidi); il regolatore positivo trascrizionale BotR/A (178 aminoacidi); e la proteina P47 (416 aminoacidi) per la quale si ipotizza un ruolo regolativo. Non sono presenti sequenze codificanti le emo-agglutinine. L'analisi comparata (BLAST) delle sequenze aminoacidiche dedotte per le proteine con quelle presenti in banca dati evidenzia per la tossina botulinica un'identità del 99% con quella di tipo A2 (5 aminoacidi diversi) e del 90% con quella di tipo A1 (128 aminoacidi diversi). Per le restanti proteine del complesso le omologie risultano rispettivamente del 95% (NTNH), 92% (P47), 97% (BotR/A), 88% (ORFX1), 100% (ORFX2) con quelle delle stesse proteine del ceppo A2 per il quale sono disponibili le sequenze relative.

## RISULTATI DI UNA SORVEGLIANZA NAZIONALE SU UN TIPO DI SALAME ITALIANO

Paolo Aureli, Alfonsina Fiore, A. Gattuso, M. Casale, M.C. D'Ottavio, M. Gianfranceschi  
Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari  
Istituto Superiore di Sanità - Roma

È stata condotta una sorveglianza nazionale su un tipo di salame suino italiano (salame cacciatore), allo scopo di valutare la frequenza ed il livello di contaminazione di *Listeria monocytogenes* e studiare le caratteristiche sierologiche e molecolari dei ceppi isolati.

Il prodotto preso in esame è stato selezionato in base ad aspetti microbiologici, tecnologici, nutrizionali e commerciali.

Per la finalità dello studio è stato adottato il piano di campionamento previsto dall' International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) per questa categoria di prodotti e per il patogeno considerato.

Sono stati analizzati 1020 campioni prelevati in due diversi periodi dell'anno (autunno/inverno 2002 e primavera/estate 2003), alla fine del ciclo produttivo ed immediatamente prima della commercializzazione. I prelievi sono stati effettuati presso 17 ditte italiane aventi produzioni annue variabili da 1 a 2000 tonnellate e distribuzione in circa l'80% del territorio nazionale.

Su tutti i campioni analizzati sono state effettuate la ricerca e la numerazione della *L.monocytogenes*, secondo la norma ISO 11290 parte 1 e 2:1996, la sierotipizzazione e la tipizzazione molecolare mediante PFGE. Si è proceduto inoltre alla determinazione dei valori del pH e dell'attività dell'acqua (aw).

La *L.monocytogenes* è risultata presente in media nel 22,7% (232/1020) dei campioni analizzati, ma sempre a livelli di contaminazione bassi (< 10ufc/g). La percentuale della contaminazione oscillava tra l'1,6 ed il 58,3%; e in circa il 35,2 % delle aziende la contaminazione è risultata inferiore al 10%. Alcuni dei fattori considerati, quali l'utilizzo di latte in polvere e di budello naturale ed artificiale, non sono risultati significativamente legati alla contaminazione. Sono risultati invece, altamente significative le dimensioni dell'impianto e l'attività dell'acqua.

In quasi la metà delle ditte sono state riscontrate anche altre specie di *Listeria* (prevalentemente *L.innocua* e *L.welshimeri*) con percentuali variabili dal 50% al 90% circa.

I sierotipi più frequentemente isolati sono stati: 1/2c (53%), 1/2a (22%), 1/2b (8%) e 4b (12%) e i pulsotipi più ricorrenti sono stati il 2, il 3 ed il 39.

I risultati di questa sorveglianza evidenziano che la contaminazione del prodotto è prevalentemente imputabile ad una continua introduzione del microrganismo lungo la filiera produttiva piuttosto che ad una presenza endemica del microrganismo nell'impianto di produzione.

## 60kDa "HEAT SHOCK PROTEIN" DI *Chlamydia pneumoniae* PROMUOVE IN CELLULE DENDRITICHE MONOCITO-DERIVATE, UNA RISPOSTA IMMUNE DI TIPO T HELPER-1 TRAMITE LA PRODUZIONE DI IL-12/IL-23.

Clara Maria Ausiello, Fabiana Spensieri, Giorgio Fedele, Raffaella Palazzo, Alessandra Ciervo e Antonio Cassone  
Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immuno-mediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

*Chlamydia pneumoniae* (Cp) è un batterio intracellulare, che è stato associato alla patogenesi se non propriamente all'eziologia dell'arteriosclerosi ed ai conseguenti eventi coronarici acuti. La risposta immune diretta contro le "heat shock proteins" (HSPs) di Cp ed in particolare la produzione di citochine pro/anti infiammatorie, sembra costituire un legame tra l'infezione cronica e l'aterosclerosi. Poiché l'immunità verso patogeni intracellulari è prevalentemente controllata da meccanismi effettori cellulomediati in cui le cellule dendritiche (DC) giocano un ruolo critico, sia induttivo che regolatorio, in questo studio abbiamo valutato il ruolo svolto da Cp e dalle proteine ricombinanti 60kDa HSP (Cp-HSP60) e 10kDa HSP (Cp-HSP10) nel promuovere la maturazione di DC monocito-derivate (MDDC) e la loro capacità di polarizzare i linfociti T al fine di modulare la risposta immune. In MDDC, i corpi elementari di Cp (Cp-EB) e Cp-HSP60 ma non Cp-HSP10 sono in grado di indurre una forte maturazione cellulare analizzata mediante l'espressione di molecole co-stimolatorie ed altri marcatori specifici. Cp-EB e Cp-HSP60 sono inoltre in grado di indurre in MDDC la secrezione di citochine regolatorie e di incrementare la presentazione antigenica favorendo un fenotipo T helper (h)-1. L'analisi approfondita delle citochine appartenenti alla famiglia della IL-12 ha dimostrato che Cp-HSP60 induce in MDDC l'espressione sia di mRNA per p35 e p40, le due catene proteiche che formano IL-12p70, sia di mRNA per p19 che insieme alla p40 forma IL-23, una nuova citochina Th1 recentemente descritta. La polarizzazione preferenziale della risposta immune verso il fenotipo Th1 indotta da Cp-HSP60 in MDDC, sembra essere dovuta all'espressione concomitante di IL-12 e IL-23. In conclusione i nostri risultati confermano ed espandono le recenti evidenze circa un ruolo critico della stimolazione cronica delle risposte immuni di tipo Th1 verso HSPs di *Chlamydia pneumoniae* e/o le proteine omologhe della placca aterosclerotica nella patogenesi dell'arteriosclerosi e delle conseguenti coronaropatie.

## CARATTERISTICHE DI VIRULENZA DI CEPPI DI *CAMPYLOBACTER JEJUNI* TIPIZZATI MEDIANTE RIBOTIPIZZAZIONE CON *PSI*

Baffone W<sup>1</sup>., De Cesare A<sup>2</sup>., Campana R<sup>1</sup>., Patrone V<sup>1</sup>., Vittoria E<sup>1</sup>., Bondioli V<sup>2</sup>., Manfreda G<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Istituto di Scienze Tossicologiche, Igienistiche ed Ambientali, Università di Urbino "Carlo Bo"

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Alma Mater Studiorum-Università degli Studi di Bologna

Il meccanismo con cui *C.jejuni* provoca malattia nell'uomo non è ancora ben definito, anche se capacità adesive, invasive e abilità nel produrre tossine sono stati proposti quali determinanti di virulenza. Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare le caratteristiche di virulenza di 21 ceppi non epidemiologicamente correlati di *C. jejuni*, isolati dall'uomo (9 ceppi) e dal pollame (12 ceppi) e caratterizzati geneticamente mediante ribotipizzazione con *PsI*.

Le proprietà adesive ed invasive sono state studiate infettando monostrati di Caco-2, mentre la capacità di produrre entero/citotossine e CDT è stata valutata su monostrati di CHO ed HeLa. E' stata inoltre determinata la presenza di 7 geni correlati alla virulenza (*cadF*, *ceuE*, *flaA*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* e *cdt* cluster) con una tecnica di PCR usando specifici primers.

Tutti i ceppi di provenienza umana hanno dimostrato capacità adesive ed invasive su cellule Caco2; al contrario queste proprietà sono apparse meno diffuse nei ceppi di origine animale (83% adesivi e 25% invasivi). Nessun ceppo si è dimostrato abile ad elaborare enterotossina, mentre il 57% degli stipiti ha indotto effetti citotossici sulle HeLa e il 47% sulle CHO. L'attività citotossica è risultata una proprietà maggiormente espressa dai ceppi animali. I geni *cadF*, *flaA*, *ceuE*, coinvolti nel processo adesivo, e *cdtB* sono stati rinvenuti nel 100% dei ceppi saggiati, mentre i geni *cdtA* e *cdtC* sono stati ritrovati rispettivamente nel 71% (7 umani e 8 animali) e nel 24% (1 umano e 4 animali) degli isolati. La presenza di *cdt* cluster è stata osservata in più del 50% dei ceppi. La produzione di elevate quantità di CDT è stata evidenziata soprattutto negli stipiti che esibivano la contemporanea presenza dei geni *cdtA*, *cdtB* e *cdtC*, senza sostanziali differenze in relazione alla provenienza dei ceppi.

L'alta prevalenza delle caratteristiche di virulenza nei tests *in vitro* e la presenza di geni ad essa correlata nei ceppi saggiati dimostra che questi possibili determinanti di patogenicità sono piuttosto diffusi negli isolati di *C.jejuni* sia di provenienza umana che animale caratterizzati dallo stesso profilo di ribotipizzazione. I nostri risultati suggeriscono l'importanza degli animali quale reservoir di ceppi virulenti di *C.jejuni* e sottolineano il potenziale rischio che questi rappresentano per la salute umana.

## IDENTIFICAZIONE DI BIOFILM BATTERICI NELLE INFEZIONI CRONICHE ADENOIDEE E TONSILLARI.

<sup>1</sup>Ardito F., <sup>2</sup>Calò L., <sup>2</sup>Galli J., <sup>1</sup>Mancinelli L., <sup>3</sup>Bassotti E., <sup>2</sup>Paludetti G. e <sup>1</sup>Fadda G.

<sup>1</sup>Istituto di Microbiologia, <sup>2</sup>Istituto di Otorinolaringoiatria ed <sup>3</sup>Istituto di Odontoiatria, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma.

**Introduzione:** La patologia flogistica adenotonsillare rappresenta il quadro clinico più comune in ambito otorinolaringoiatrico e nonostante i protratti e ripetuti cicli di terapia medica antinfiammatoria ed antibiotica, può talora assumere un andamento cronico recidivante tale da richiedere un trattamento chirurgico. L'identificazione dei biofilm batterici come comunità multicellulari organizzate, ha consentito di riconoscere un importantissimo fattore di virulenza che sembra concorrere in numerose infezioni, alla loro ricorrenza e cronicizzazione. Scopo di questo lavoro è stato quello di identificare la presenza di biofilm batterici in campioni adenoidei e tonsillari prelevati da tali distretti in corso di interventi di adenotomia e adenotonsillectomia.

**Materiali e metodi:** sono stati esaminati campioni di 12 pazienti, 4 adulti e 8 in età pediatrica, ricoverati consecutivamente presso la Clinica ORL del Policlinico Universitario "A.Gemelli", sottoposti ad interventi di adenotonsillectomia (4 pazienti), adenoidectomia (4 pz) e tonsillectomia (4 pz), per processi infettivi ricorrenti. Sono stati prelevati 16 campioni (8 di tessuto adenoideo e 8 di tessuto tonsillare) sui quali sono stati effettuati l'esame culturale e l'osservazione al microscopio elettronico a scansione. **Risultati:** 3 campioni di tessuto tonsillare evidenziavano coltura positiva per *Stafilococcus aureus*, 3 per streptococco a-emolitico; 6 campioni di tessuto adenoideo presentavano una coltura positiva per *Haemophilus influenzae*, 1 *Streptococcus pyogenes*, ed 1 streptococco a-emolitico. In tutti i campioni adenoidei ed in 5/8 campioni tonsillari è stato riscontrata la presenza di Biofilm batterici. **Conclusioni:** L'evidenza anatomica dei biofilm batterici (82,5% dei campioni) nel nostro studio, benché relativa ad un campione ancora esiguo, conferma la stretta correlazione tra presenza di biofilm e cronicizzazione dei processi infettivi adenotonsillari ed antibiotico resistenza anche in corso di antibiotico terapia mirata. Ulteriori studi su campioni tissutali più numerosi e dei vari distretti ORL soggetti a patologia cronica e recidivante potranno confermare questi dati preliminari ed individuare molecole che facilitano la penetrazione dell'antibiotico nel biofilm o a bloccare la comunicazione interna allo stesso.

## EMERGENZA DELLA RESISTENZA A LINEZOLID IN *Enterococcus faecium* VANCOMICINO-RESISTENTI APPARTENENTI ALLA LINEA GENETICA MLST-C1.

Maria Grazia Bonora<sup>1</sup>, Maurizio Solbiati<sup>2</sup>, Erminia Stepan<sup>3</sup>, Antonella Zorzi<sup>3</sup>, Aldo Luzzani<sup>4</sup>, e Roberta Fontana<sup>1,3</sup>

Dipartimento di Patologia, Sezione di Microbiologia, Università di Verona<sup>1</sup>; Osservatorio Epidemiologico, Azienda Ospedaliera di Verona<sup>2</sup>; Servizio di Microbiologia, Immunologia e Virologia, Azienda Ospedaliera di Verona<sup>3</sup>; Unità di Rianimazione e Terapia Intensiva, Azienda Ospedaliera di Verona<sup>4</sup>; Verona.

Linezolid, antibiotico appartenente al gruppo degli oxazolidinoni, è stato di recente introdotto come nuova opzione terapeutica in caso di infezioni da cocchi gram-positivi, inclusi enterococchi resistenti a vancomicina (VRE). Questo lavoro presenta uno studio sulla resistenza a linezolid in *Enterococcus faecium* vancomicino-resistenti (VREF) isolati da pazienti ricoverati al Reparto di Rianimazione e Terapia Intensiva dell'Ospedale Civile Maggiore di Verona. Sono stati analizzati 35 VRE isolati da 127 pazienti nel 2004: in questi pazienti il tasso di colonizzazione da VRE è stato del 22.8%, mentre il tasso di infezione da VRE del 7.4%. *E. faecium* vancomicino-resistenti non sensibili a linezolid sono stati isolati da 14 pazienti: 8 pazienti presentavano ceppi con suscettibilità intermedia a linezolid (MIC = 4 µg/ml) e 6 pazienti ceppi resistenti a linezolid (MIC ≥ 8 µg/ml). Sono state raccolte le informazioni cliniche relative ai pazienti colonizzati: 5 pazienti presentavano fattori di rischio per l'acquisizione di infezioni da VREF, ma nel caso di un paziente i fattori di rischio erano assenti. Tutti i ceppi resistenti a linezolid appartenevano al genotipo *vanA* ed erano altamente resistenti ad ampicillina, streptomina e gentamicina, ma sensibili a quinopristina/dalfopristina. Inoltre tutti presentavano la mutazione G2576T nel gene per rRNA 23S, responsabile della resistenza a linezolid. La tipizzazione dei ceppi VREF resistenti a linezolid mediante PFGE ha portato all'individuazione di 4 patterns: 3 pazienti presentavano pulsotipi geneticamente distinti, mentre 3 pazienti mostravano pulsotipo identico o strettamente correlato. Tutti gli isolati erano positivi per la presenza del gene di virulenza *esp*. La Multilocus Sequence Typing (MLST) ha individuato lo stesso profilo allelico in tutti i ceppi (ST78), permettendo di raggruppare i ceppi nella linea genetica C1, di recente individuata in *E. faecium* epidemici con diffusione planetaria. Vista l'importanza terapeutica di linezolid nelle infezioni da *E. faecium* vancomicino-resistenti, l'alta prevalenza di *E. faecium* non sensibili a linezolid in pazienti gravemente malati, sta assumendo un'importanza considerevole.

## CINETICA DELLA RISPOSTA VIROLOGICA E DELLA COMPARSA DI MUTANTI VIRALI IN PAZIENTI CON MALATTIA CRONICA DI FEGATO HBV-CORRELATA IN TERAPIA CON ADEFOVIR

F Cardinale, D Ferraro, M Giglio, P Pizzillo, V Di Marco\*, A Craxì \*, R Di Stefano.

Dip di Igiene e Microbiologia, \*Dip Biomedico di Medicina Interna e Specialistica, Università di Palermo

**Background:** L'efficacia della terapia con lamivudina (LAM) in pazienti con malattia cronica di fegato da HBV è limitata dall'insorgenza di mutanti virali, con una frequenza del 20%/anno. L'Adefovir dipivoxil (ADV), precursore di un analogo aciclico dell'adenina, ha una potente attività antivirale *in vitro* e *in vivo* nei confronti di HBV *wild type* e di mutanti LAM resistenti.

**Obiettivi:** Valutare in pazienti LAM resistenti la cinetica di risposta alla terapia con ADV e individuare una riattivazione virale, correlabile con la comparsa di mutanti farmaco-resistenti.

**Pazienti e metodi:** 32 pazienti, M/F 29/3, età media 49.8 anni, con malattia cronica da HBV, genotipo D, resistenti alla terapia con LAM, sono stati sottoposti a trattamento con ADV (10 mg/die). La cinetica di riduzione dell'HBV-DNA sierico è stata valutata mediante Versant bDNA 3.0 (Bayer) e la soppressione della replicazione virale a livelli minimali con una nested PCR *home made* (sensibilità 0.1 UI/ml). La ricerca dei mutanti virali è stata effettuata mediante sequenziamento del gene pol secondo il metodo ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (AB) ed elettroforesi capillare in ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

**Risultati e conclusioni:** I 32 pazienti, osservati per una mediana di 27 mesi sotto ADV (range 20-32), avevano una carica virale iniziale di  $48 \times 10^6$  copie/ml. Al baseline, 4/18 pazienti presentavano la mutazione YVDD, 10/18 YIDD, 4/18 YVDD+L180M. 23 pazienti, con una carica virale di  $45.5 \times 10^6$  copie/ml a T0, dopo 5 mesi (range 1-14), hanno negativizzato l'HBV-DNA in PCR. 5 pazienti, con una carica virale iniziale di  $80 \times 10^6$  copie/ml, pur riducendo la viremia, hanno mantenuto una carica virale  $> 10^5$  copie/ml. 4 pazienti, con viremia basale di  $17 \times 10^6$  copie/ml, negativizzavano l'HBV-DNA dopo 8 mesi (range 5-12) e mantenevano tale condizione per 12 mesi (range 9-15). La riattivazione si associava a cariche virali variabili da  $< 2000$  a  $10^5$  copie/ml ed il sequenziamento della regione pol di HBV evidenziava in 2 di essi la mutazione N236T. La valutazione della cinetica di risposta ad ADV mostra quindi, anche nei pazienti LAM resistenti, una inibizione della replicazione virale in 2/3 dei trattati ed una insensibilità primaria al trattamento nei restanti pazienti. La comparsa di una mutazione da farmacoresistenza evidenzia quindi la necessità di una terapia di combinazione per ritardare l'insorgenza di resistenza virale.

## MALATTIA PARADONTALE E CARDIOPATIA ISCHEMICA: UNO STUDIO STATISTICO E MICROBIOLOGICO.

F. Cavallini, S. Cagnacci, M Latronico, A. Segantini, G. Blasi, E. A. Debbia.  
Istituto di Microbiologia- Università di Genova

### Introduzione:

Diversi studi hanno dimostrato come la patologia parodontale sia associata con frequenza molto elevata alla aterosclerosi. Questo studio, si prefigge due obiettivi principali: valutare la correlazione epidemiologico-statistica tra malattia parodontale e cardiopatia ischemica per individuare i fattori di rischio; ricercare specie batteriche eventualmente associate in modo significativo alla cardiopatia ischemica.

### Materiali e metodi:

Tra il 2002 e il 2004 è stato considerato un gruppo di 27 persone, ricoverate presso un Unità Coronarica con diagnosi di angina pectoris e/o infarto acuto del miocardio, e un gruppo controllo costituito da 16 persone che non presentavano nessun precedente di cardiopatia ischemica.

A tutti i pazienti è stato eseguito un esame colturale della placca sottogengivale.

### Risultati:

L'odds ratio tra le variabili di tipo parodontale e la malattia cardiovascolare ischemica hanno indicato che al crescere della compromissione parodontale aumenta notevolmente il rischio di cardiopatia.

In particolare se calcolando l'odds ratio tra i pazienti con tre o più siti con profondità di sondaggio >6mm è stato notato un rischio di cardiopatia ischemica 12,6 volte superiore con un p-value di 0.025 rispetto a quella di controllo

La ricerca microbiologica ha rivelato che la quasi totalità dei soggetti-caso (89,4%) presentava almeno uno dei batteri putativi parodontopatogeni nei siti analizzati mentre nei controlli questa percentuale è minore (46,6%). E' stato quindi creato un altro indice di valutazione, definito "presenza di parodontopatogeni nel campione di placca sottogengivale". L'analisi con il Test di Fisher, ha fornito un P-value pari a 0,010; ciò significa che i cardiopatici presentavano almeno un parodontopatogeno nel campione di placca sottogengivale più frequentemente rispetto ai soggetti cardiologicamente sani,. La presenza di *Porphyromonas gingivalis* tra i soggetti cardiopatici risulta ampiamente superiore alle altre specie batteriche identificate (47%).

In conclusione la presenza di 3 o più siti con PD>6mm risulterebbe un importante fattore di rischio per la cardiopatia ischemica, mentre la prevalenza di *Porphyromonas gingivalis* da noi riscontrata tra i soggetti cardiopatici richiede indagini più specifiche per valutarne a fondo la significatività.

## CHLAMYDIA PNEUMONIAE FATTORE DI RISCHIO CARDIOVASCOLARE IN PAZIENTI IN DIALISI

R. Sessa, G. Schiavoni, M. Di Pietro, M. Rassa<sup>1</sup>, S. Cazzavillan<sup>1</sup>, M. De Cal<sup>1</sup>, G. Cervino, A. Vitale, G. Balduino, M. del Piano  
Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, Università degli Studi di Roma "La Sapienza" <sup>1</sup>Dipartimento di Malattie Infettive e Medicina Tropicale-Ospedale San Bortolo, Vicenza

La mortalità cardiovascolare è la principale causa di morte nei pazienti sottoposti a dialisi, con una mortalità che è di 10-30 volte più elevata rispetto alla popolazione generale. L'elevata incidenza delle patologie cardiovascolari nei pazienti con insufficienza renale cronica è stata recentemente attribuita, non solo a fattori di rischio tradizionali, quali dislipidemia, ipertensione, fumo e diabete, ma anche a fattori di rischio non tradizionali, quali processi infiammatori ed infettivi.

Tra gli agenti infettivi, la *Chlamydia pneumoniae*, batterio patogeno intracellulare obbligato, è stata individuata quale fattore di rischio nello sviluppo dell'aterosclerosi.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare la prevalenza di *C. pneumoniae* in pazienti con insufficienza renale cronica sottoposti a dialisi.

Sono stati esaminati 40 pazienti (28 uomini e 12 donne; età media 67±12 aa) con insufficienza renale cronica in dialisi, affetti da arteriopatia cronica, e, come gruppo controllo, 20 donatori di sangue selezionati per età, sesso, stato sociale e area geografica. Da ogni soggetto è stato prelevato un campione di sangue per la ricerca di DNA di *C. pneumoniae* nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC).

La ricerca di DNA di *C. pneumoniae* nei PBMC è stata effettuata utilizzando la real-time PCR, basata sul frammento *PstI* specie-specifico di *C. pneumoniae*, e ogni campione di PBMC è stato analizzato in un numero di tre replicati.

E' stata riscontrata nei pazienti con insufficienza renale cronica una percentuale di positività alla *C. pneumoniae* del 35%, con una quantità di DNA di *C. pneumoniae* compresa tra 111 e 946 copie genomiche/reazione, mentre non è stata riscontrata presenza di DNA di *C. pneumoniae* nei donatori di sangue (P=0.0001).

I nostri dati sono i primi risultati ottenuti con la tecnica di real-time PCR in pazienti sottoposti a dialisi e supportano l'ipotesi che l'infezione da *C. pneumoniae* potrebbe essere considerata un fattore di rischio cardiovascolare nei pazienti con insufficienza renale cronica.

## CONFRONTO DI DIFFERENTI SISTEMI DI OTTURAZIONE CANALARE NEL PREVENIRE LA COLONIZZAZIONE BATTERICA

A. Angeretti, N. Mandras, G. Banche, V. Allizond, V. Tullio, D. Pasqualini\*, D. Adlerstein\*\*, E. Berutti\*, A.M. Cuffini

Dipartimento di Sanità Pubblica e Microbiologia, Università di Torino

\*Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Università di Torino

\*\*Diasorin, Italia

In endodonzia il tipo di otturazione del sistema radicale del canale apicale risulta fondamentale per il successo della terapia endodontica: spesso infatti una inadeguata otturazione apicale porta al fallimento nei trattamenti endodontici non chirurgici legati a colonizzazione batterica. In questo studio effettuato *in vitro* si è cercato di valutare l'eventuale infiltrazione batterica attraverso i 5 mm apicali dell'otturazione endodontica mettendo a confronto due differenti sistemi: Guttaperca con cemento endodontico e Resilon-Epiphany. I campioni, rappresentati da 80 denti umani estratti monoradicolarmente, sono stati suddivisi in 4 gruppi che presentavano rispettivamente: otturazione con Resilon-Epiphany con e senza pretrattamento con idrossido di calcio [Ca(OH)<sub>2</sub>] e otturazione con Guttaperca con e senza pretrattamento con Ca(OH)<sub>2</sub>. Essi sono stati contrassegnati in maniera random e quindi inoculati con 150 µl di una coltura overnight di *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 diluita 1:3. L'eventuale infiltrazione batterica dei campioni e la conseguente contaminazione del terreno sterile, in cui l'apice della radice veniva immerso, è stata evidenziata inizialmente come torbidità del terreno stesso ed in seguito confermata, sempre a partire dallo stesso terreno, con PCR e con la tecnica di reazione di amplificazione omogenea OCEAN (One Cut Event Amplification reaction). Dai risultati ottenuti nei 45 giorni di osservazione si può constatare che, nonostante i nostri campioni siano stati sottoposti ad una aggressione batterica superiore rispetto a quella che si verifica normalmente *in vivo* (la concentrazione dei batteri è molto maggiore rispetto a quella dell'endodonto e del parodonto in natura), i campioni infiltrati sono risultati soltanto 10 su 80. In particolare emerge che il classico metodo di otturazione con Guttaperca ha mostrato una maggiore resistenza all'infiltrazione batterica (2 campioni infiltrati) rispetto al nuovo sistema di otturazione Resilon-Epiphany (8 campioni infiltrati). In entrambi i casi il pretrattamento con Ca(OH)<sub>2</sub> ha migliorato la resistenza all'infiltrazione.

## SENSITITRE YO5 PER L'ANTIMICOGRAMMA DI LIEVITI E MUFFE

Drago M, Scaltrito MM, Sisto F, Grimaldi C, Astolfi\* A, Frugoni° S, Dubini F e Morace G

Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Milano; \*Dip. Medicina di Laboratorio Ospedale Ca' Granda Niguarda, Milano, °Laboratorio Analisi, Pio Albergo Trivulzio, Milano

Il nuovo pannello Sensititre YO5, non ancora disponibile per antimicogrammi di routine, ha aggiunto ai 6 precedenti antifungini la caspofungina, un'echinocandina con un ampio spettro d'azione ed un bersaglio d'azione diverso dall'ergosterolo. Il pannello è stato utilizzato per l'antimicogramma di 128 ceppi clinici di funghi di cui 16 *Aspergillus* spp. e 112 *Candida* spp. Come ceppi di controllo sono stati utilizzati *C. krusei* ATCC® 6258, *C. parapsilosis* ATCC® 22019 e *A. flavus* ATCC® 204304. Per 42 ceppi, i risultati per fluconazolo, itraconazolo, voriconazolo e caspofungina sono stati valutati in comparazione con quelli ottenuti applicando i protocolli NCCLS 27A2 e 38A per i saggi di sensibilità *in vitro* agli antifungini rispettivamente per lieviti e funghi filamentosi produttori conidi. I risultati ottenuti, oltre a confermare che la maggior parte dei ceppi clinici (lieviti e muffe) risulta sensibile agli antimicotici sistemici, dimostra che il nuovo pannello Sensititre YO5 può essere considerato una valida alternativa alle metodiche raccomandate dall'NCCLS e che i risultati ottenibili per la caspofungina non sono influenzati dall'uso del terreno RPMI come, invece, riscontrato con i protocolli NCCLS.

## LE PROTEINE DI SUPERFICIE BspA-like DI *TRICHOMONAS VAGINALIS* SONO IMMUNOGENE ED INDUCONO UNA FORTE RISPOSTA ANTICORPALE IN PAZIENTI INFETTATI DAL PROTOZOO

Nicia Diaz<sup>1</sup>, Paola Rappelli<sup>1</sup>, Daniele Dessì<sup>1</sup>, Giovanna Sanciu<sup>1</sup>, Martin Embley<sup>2</sup>, Robert Hirt<sup>2</sup>, Pier Luigi Fiori<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari, Italia; <sup>2</sup>School of Biology, The Devonshire building, University of Newcastle, UK.

Le proteine BspA-like di *Trichomonas vaginalis* appartengono ad una famiglia genica omologa a BspA, una proteina di superficie responsabile della colonizzazione della mucosa orale umana espressa da alcuni patogeni, quali *Tannerella forsythensis*. La chiave strutturale coinvolta con il *binding* alle molecole della matrice extracellulare mucosale, è la presenza di un particolare *leucine rich repeat* (LRR) molto simile a un motivo presente nelle proteine di *Treponema pallidum* (TpLRR) coinvolte con i processi di adesione e colonizzazione. Come per tutte le molecole di superficie coinvolte con i meccanismi di patogenicità, è di grande interesse conoscere se queste inducono una risposta anticorpale, specie se in grado di controllare, almeno parzialmente, le prime fasi dell'infezione.

E' stata valutata la risposta verso *T.vaginalis* in 591 sieri di persone ad alto e basso rischio per malattie a trasmissione sessuale (sia HIV positive che negative). I 120 sieri positivi per anticorpi verso il protozoo, sono stati quindi saggiati per valutare la reattività specifica verso BspA-like. Poiché non è stato possibile purificare BspA-like in forma ricombinante sia utilizzando diversi sistemi di espressione procariotici che eucariotici (sia lieviti che baculovirus), sono stati sintetizzati quattro peptidi disegnati sulla base delle sequenze putativamente immunogeniche della proteina; due peptidi rappresentano sequenze intracellulari e altri due, domini extracellulari. I peptidi sono stati quindi coniugati a *carrier* proteici ed utilizzati separatamente sia per immunizzare animali da esperimento, che per saggiare la risposta anticorpale specifica nei sieri positivi per il protozoo, mediante tecniche immunoenzimatiche.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che i tre peptidi su quattro inducono in animali da esperimento una risposta anticorpale specifica verso BspA-like; inoltre è stato evidenziato che una percentuale pari a 80-85% dei sieri positivi per *T.vaginalis*, riconosce almeno uno dei quattro peptidi, sia frammenti intra che extracellulari.

Ulteriori studi saranno necessari per determinare il ruolo della risposta anticorpale specifica nel controllo dell'infezione da *T.vaginalis*.

## EPIDEMIOLOGIA DELLE INFEZIONI DAROTAVIRUS DI GRUPPO A A PALERMO: EVOLUZIONE GENETICA DEI CEPPI ISOLATI DAL 1991 AL 2004

I rotavirus di gruppo A vengono caratterizzati in base a due proteine del capsido esterno, VP7 e VP4, entrambe inducenti anticorpi neutralizzanti. Attualmente sono stati identificati dieci differenti tipi G (VP7-correlati) e 10 tipi P (VP4-correlati) di rotavirus umani. Ceppi G1P[8], G2P[4], G3P[8] e G4P[8] sono ubiquitari. Nella popolazione infantile i rotavirus sono i più frequenti agenti di enterite, causa di elevati tassi di ospedalizzazione nei paesi industrializzati e di mortalità nei paesi in via di sviluppo. Indagini epidemiologiche effettuate in bambini di età inferiore ai 3 anni ospedalizzati per enterite a Palermo dal 1991 al 2004 hanno rivelato una prevalenza oscillante dal 20 al 50%. La caratterizzazione G/P dei ceppi virali, effettuata mediante saggi di siero e genotipizzazione, ha rivelato a Palermo una diffusa circolazione di ceppi con specificità G1[P8], G2[P4] e G4[P8], responsabili del 90% degli episodi diarroici, e dal 1999 l'emergenza di ceppi con specificità G9[P8]. La presenza di G1[P8] è costante, con oscillazioni negli anni dal 5,7% all'86,8% dei ceppi circolanti. I ceppi con specificità G4[P8] presentano dei picchi ad intervalli di 4-6 anni, quando sostituiscono nella prevalenza il tipo G1. La circolazione di ceppi G2 è sporadica e presenta un incremento ad intervalli di 8-10 anni.

L'analisi dei geni codificanti per VP7 and VP4 ha consentito di definire l'evoluzione dei ceppi circolanti a Palermo. Il confronto delle regioni aminoacidiche variabili di VP7 e di VP4 ha permesso di riconoscere la comparsa di nuovi ceppi come conseguenza di mutazioni puntiformi o di fenomeni di riassortimento genico nell'ambito dei ceppi endemici palermitani o per l'introduzione di ceppi diffusi in altre aree geografiche. Mutazioni puntiformi sono responsabili della persistenza dei ceppi G1, mentre la introduzione di nuovi ceppi precedentemente circolanti in altri paesi è stata dimostrata per G2[P4] e G4[P8]. Sono stati evidenziati fenomeni di riassortimento con il trasferimento del gene codificante per VP4 fra differenti tipi G.

Considerando il ruolo degli anticorpi neutralizzanti anti-VP7 ed anti-VP4 nella immunità anti-rotavirus e gli sforzi attualmente profusi per l'allestimento di vaccini efficaci, i risultati ottenuti sottolineano la necessità di una continua sorveglianza nelle diverse aree geografiche allo scopo di evidenziare la comparsa di varianti antigeniche.

## ANALISI DELLA RISPOSTA VIROLOGICA PRECOCE ALLA TERAPIA ANTIRETROVIRALE DI ASSOCIAZIONE.

Gregori G., Faraoni S., Di Garbo A., Ghiotti M., Morettini R., Milia M.G.

Dipartimento di Diagnostica di Laboratorio - Laboratorio di Biologia Molecolare.  
Ospedale Amedeo di Savoia, Torino.

**INTRODUZIONE.** La resistenza ai farmaci anti-retrovirali è associata ad una diminuita risposta al trattamento ed un incremento della mortalità in pazienti infettati da HIV. Più rapido è il decremento nella viremia plasmatica, in risposta al trattamento, e maggiori sono solitamente le possibilità di successo della terapia oltre alla minore possibilità di insorgenza di farmaco-resistenze. La rapidità dell'azione antiretrovirale potrebbe essere ritenuta, nell'infezione acuta, di importanza ancora più cruciale che nell'infezione cronica, in funzione della necessità di limitare la diversificazione della popolazione virale in senso quasi-specie.

Lo scopo di questa ricerca è stato valutare la cinetica virale in risposta al trattamento anti-retrovirale in due categorie di pazienti: advanced naive e pazienti con infezione acuta.

**METODI.** Sono stati analizzati 87 campioni di plasma per la determinazione della viremia da HIV, appartenenti a 10 pazienti, 7 advanced naive (5 posti in terapia con 2 NRTI associati a lopinavir/ritonavir (LPV/RTV); 2 hanno assunto una HAART contenente 2 NRTI + LPV/RTV + enfuvirtide) e 3 pazienti con infezione acuta (2 NRTI + LPV/RTV + enfuvirtide), afferenti all'Ospedale Amedeo di Savoia di Torino.

L'analisi di quantizzazione è stata eseguita utilizzando la metodica "HIV-1 Monitor" di Roche Diagnostics.

**RISULTATI.** Il valore di EC<sub>50</sub> dei pazienti advanced naive è risultato pari a 1,5 giorni e sovrapponibile nei due gruppi di trattamento. Il valore di EC<sub>90</sub> è risultato in media minore nei pazienti trattati solo con Lopinavir (5,37 giorni vs 2,93 giorni) rispetto a quelli trattati anche con Enfuvirtide. Nell'ambito delle tre infezioni acute si è osservato un decremento dei valori di HIV-RNA di poco più lento rispetto alle infezioni croniche avanzate. Il valore di EC<sub>50</sub>, in questo gruppo, non si discosta significativamente da quanto osservato nelle infezioni croniche (1,67 giorni vs 1.55 giorni). Il valore di EC<sub>90</sub> risulta più elevato della media delle infezioni croniche.

## VALUTAZIONE DELLE RESISTENZE IN VITRO DI CEPPI DI *HELICOBACTER PYLORI* ISOLATI DA BIOPSIE GASTRICHE DI PAZIENTI GIÀ SOTTOPOSTI A TERAPIA ERADICANTE E PAZIENTI MAI SOTTOPOSTI A TERAPIA.

M.R. Iovene, P.A.Pilloni, B.Giordano, F.Montella, M.A.Tufano.

Dipartimento di Diagnostica Microbiologica dir. Prof. M.A.Tufano

*Helicobacter pylori* (*H.p.*) è considerato l'agente eziologico di gastriti, ulcera gastrica e duodenale, carcinoma gastrico e linfoma gastrico. Negli ultimi anni si è diffusa la resistenza dell'*H. p.* nei confronti degli antibiotici d'uso, che ha comportato un incremento del "probabile fallimento terapeutico". In questo studio abbiamo valutato in vitro l'andamento della resistenza, espressa come Concentrazioni Minime Inibenti M.I.C., degli antibiotici di utilizzo verso *H.p.* isolati da due gruppi distinti di pazienti. **I gruppo:70 Pazienti**, 40 uomini e 30 donne, età 25-65 anni con sintomatologia dispeptica mai sottoposti a terapia eradicante. **II gruppo:70 Pazienti**, 38 uomini e 32 donne età 25- 65 anni con ulcera gastrica e già sottoposti a terapia eradicante. Tutti i pazienti, senza terapia per 10 giorni, venivano sottoposti a gastroscopia con prelievo biotipico dall'antro e dal corpo dello stomaco.

E' stata saggiata la sensibilità di *H.p.* isolati dall'esame culturale delle biopsie gastriche vs 6 antibiotici di uso clinico: metronidazolo, claritromicina, amoxicillina, tetraciclina, levofloxacina. Le M.I.C. sono state determinate mediante Epsilometer test (E-test) su piastre di Muller Hinton al sangue di montone in atmosfera microaerofila al 10% di CO<sub>2</sub>. Per il **I° gruppo** il metronidazolo e la claritromicina hanno mostrato una resistenza rispettivamente del 38% e 21%, dati che presentano un notevole incremento rispetto ai precedenti nostri studi, in cui la resistenza primaria nei confronti del metronidazolo era del 20% e per la claritromicina era del 7%. Per il **II° gruppo** è emerso un aumento parabolico delle resistenze per il metronidazolo con il 76%, e la claritromicina con il 78%, inoltre si è evidenziata anche una allarmante resistenza nei confronti dei chinolonici con il 14% per la levofloxacina che oggi viene utilizzata come presidio terapeutico "di salvataggio". **In conclusione 1)** la resistenza primaria nei riguardi degli antibiotici di più comune impiego nella terapia della infezione da *H. p.* è in aumento; **2)** la elevata resistenza riscontrata in soggetti in cui il primo ciclo di terapia è stato inefficace solleva il problema di un più oculato uso dei chemioterapici sin dal primo trattamento della infezione e di conseguenza il ricorso all'esame culturale e al conseguente antibiogramma sin dalla prima biopsia gastrica.

## CORRELAZIONI EPIDEMIOLOGICHE E MOLECOLARI TRA ENTEROCOCCHI VANCOMICINO-RESISTENTI DI ORIGINE UMANA ED ANIMALE

G. Foglia<sup>1</sup>, C. Paoletti<sup>1</sup>, G. Magi<sup>1</sup>, E. Guaglianone<sup>2</sup>, B. Facinelli<sup>1</sup>, G. Donelli<sup>2</sup>, A. Sundsfjord<sup>3</sup>, C. Pruzzo<sup>1</sup>, F. Biavasco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Microbiologia e Scienze Biomediche, Università Politecnica delle Marche, Ancona <sup>2</sup>Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

ARTRADI project, EC contract QLK2-CT-2002-00843

Lo scopo di questo studio è stato quello di analizzare le correlazioni esistenti tra enterococchi vancomicina-resistenti (VRE) isolati dai serbatoi umano ed animale. Sono stati isolati, identificati e caratterizzati per il genotipo di resistenza 141 VRE, (91 umani, di cui 21 clinici e 70 intestinali, e 50 animali) provenienti da diverse regioni italiane, e 10 VRE (5 umani e 5 animali) isolati in Norvegia. Nell'ambito degli isolati umani, 70 (*E. faecium* e *E. faecalis*) portavano il gene *vanA* e 21 (*E. gallinarum* e *E. casseliflavus*) il *vanC*. Nell'ambito di quelli animali, 47 (*E. faecium*, *E. durans*, e *E. hirae*) erano *vanA*, tre erano *vanC-1* (*E. gallinarum*), di cui uno anche *vanA*. Gli isolati *vanA* sono stati tipizzati mediante PFGE e analizzati per la localizzazione e la caratterizzazione degli elementi Tn1546. La localizzazione della resistenza è risultata plasmidica, ad eccezione di tre ceppi umani intestinali e di un ceppo animale (che portava due Tn1546, uno plasmidico e uno cromosomico). I plasmidi *vanA* avevano dimensioni variabili da 40 a >250 kb; la localizzazione su plasmidi di grandi dimensioni (>150 kb) era più frequente nei ceppi umani intestinali (30%) rispetto a quelli clinici e animali (10%). La tipizzazione del Tn1546, è stata effettuata digerendo con *ClaI* gli amplificati ottenuti utilizzando primer specifici per le IR. I ceppi che non davano amplificati IR erano sottoposti a ulteriori PCR utilizzando coppie di primer specifiche per le regioni *orf2-vanX* e *vanX-vanZ*. Gli amplificati *orf2-vanX* erano poi sottoposti a digestione con *DdeI* per evidenziare la presenza della mutazione G/T a livello del nt. 8.234. I risultati ottenuti hanno permesso di ricondurre gli elementi Tn1546 a quattro modelli principali, uno corrispondente al prototipo e gli altri caratterizzati da delezioni e/o inserzioni di varia entità.

I risultati ottenuti hanno mostrato che (i) nel complesso i VRE umani ed animali differivano sia dal punto di vista clonale che per il tipo di Tn1546, (ii) era presente una correlazione clonale tra ceppi provenienti dallo stesso serbatoio, anche se da aree geografiche diverse, (iii) i VRE umani, rispetto a quelli animali, erano caratterizzati da una maggiore diffusione clonale e una maggiore variabilità degli elementi Tn1546-like.

## DETERMINAZIONE DI POLIOMAVIRUS BK MEDIANTE REAL-TIME PCR NEL SANGUE DI PAZIENTI TRAPIANTATI DI MIDOLLO

S. Marchetti, R. Graffeo, A. Siddu, M. Ciotti<sup>1</sup>, R. Santangelo, S. Manzara, C. Favalli<sup>1</sup>, P. Cattani e G. Fadda

Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

<sup>1</sup>Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Azienda Policlinico Universitario Tor Vergata, Roma

Il poliovirus BK (BKV) è molto diffuso nella popolazione generale; l'infezione primaria è generalmente asintomatica ed il virus rimane latente nel rene e in altri distretti. I linfociti B, sensibili all'infezione, contribuiscono alla diffusione del virus nelle riattivazioni, normalmente sotto il controllo della risposta immunitaria. Nei pazienti immunocompromessi la riattivazione può essere in patologie dell'apparato urinario, quali la cistite emorragica, importante causa di morbilità nei pazienti trapiantati di midollo osseo.

Pertanto, nel presente lavoro, è stata messa a punto un'efficace metodica di Real-time PCR ed è stato condotto uno studio retrospettivo su pazienti trapiantati di midollo osseo, in terapia immunosoppressiva, per determinare la possibile correlazione tra una riattivazione dell'infezione da BKV, la carica virale riscontrabile nel sangue e lo sviluppo di cistite emorragica.

Sono stati analizzati, mediante PCR, 22 pazienti trapiantati e 107 soggetti sani, afferenti rispettivamente al reparto di Ematologia dell'Ospedale Sant'Eugenio, Roma, ed all'ambulatorio dell'Istituto di Microbiologia dell'Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma.

Per 12 pazienti con sintomi riconducibili ad infezione dell'apparato urinario è stata inoltre valutata la carica virale, mediante Real-time PCR, analizzando 74 campioni di plasma raccolti ad intervalli regolari nel follow-up.

Complessivamente 11 dei 22 (50%) pazienti trapiantati sono risultati positivi per BKV mentre tutti i campioni raccolti dai soggetti sani sono risultati negativi.

La determinazione della carica virale ha mostrato, nei diversi pazienti, una discreta variabilità (da 10<sup>2</sup> a 10<sup>5</sup> copie/ml); in alcuni pazienti sono state osservate cariche virali elevate (2x10<sup>5</sup> copie/ml) alternate a determinazioni negative. Cariche virali comprese tra 10<sup>3</sup> e 10<sup>5</sup> copie/ml sono state ripetutamente riscontrate in pazienti con diagnosi di cistite emorragica.

I risultati ottenuti suggeriscono che la tecnica di Real-time PCR sembra essere la metodica diagnostica più efficace per distinguere un'infezione attiva da una latente e per monitorare ed eventualmente individuare, nel follow-up del paziente immunocompromesso, quello a rischio di sviluppare una malattia da BKV.

## SEQUENCE-BASED-TYPING (SBT) ED AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (AFLP) QUALI METODI DI TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI STIPITI DI *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* SIEROGRUPPO 1.

Barbaro R., Bonura C., Amato T., Distefano S., Calà C., Giammanco A.

Dipartimento di Igiene e Microbiologia "G. D'Alessandro", Università degli Studi di Palermo.

La tipizzazione molecolare di *L. pneumophila* sierogruppo 1, agente eziologico di una forma di polmonite atipica ad elevata letalità che può essere contratta sia in ambiente comunitario che nosocomiale, è richiesta nelle indagini epidemiologiche per confrontare gli isolati clinici con quelli ambientali, per individuare la fonte di contaminazione e le vie di diffusione del microrganismo ed, infine, per valutare l'efficacia degli interventi di bonifica. Tra i diversi metodi di tipizzazione impiegati negli ultimi anni, l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), considerato lo "standard internazionale", è ampiamente utilizzato dai membri dello EWGLI (European Working Group on Legionella Infections) per la semplicità di esecuzione, rapidità, alto potere discriminante ed elevata riproducibilità. Ma a causa delle difficoltà legate all'interpretazione soggettiva dei risultati e della necessità che il metodo venga eseguito secondo precise indicazioni dettate dallo EWGLI, è stato proposto un nuovo metodo, l'SBT (Sequence-Based-Typing), basato sul sequenziamento di sei loci genici specifici: *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*. Tale sistema di tipizzazione, fondato sulla combinazione degli alleli di ciascuno dei loci sequenziati, si rivela altamente riproducibile, rapidamente eseguibile e garantisce risultati facilmente analizzabili e comparabili tramite il database di sequenze creato dallo EWGLI. Per tale ragione, l'SBT è stato proposto come nuovo "gold standard" per la tipizzazione molecolare di isolati di *L. pneumophila* sierogruppo 1.

Sulla base di tali presupposti è stata analizzata la variabilità genetica di 96 stipiti di *L. pneumophila* sierogruppo 1 isolati presso il nostro laboratorio a seguito di casi sospetti di legionellosi utilizzando comparativamente ambedue le metodiche, l'AFLP ed l'SBT. Inizialmente si è fatto ricorso all'AFLP sia tramite reagenti in uso nel nostro laboratorio (PCR "home-made") che seguendo le specifiche indicazioni suggerite dalla seconda versione dello "Standard EWGLI AFLP Protocol" ([www.ewgli.org](http://www.ewgli.org)). Successivamente, per verificare l'attendibilità dei dati ottenuti e valutare l'applicabilità dell'AFLP come metodo preliminare di tipizzazione, è stata impiegata l'SBT.

## IMPIEGO DEL QUANTIFERON-TB GOLD COME POTENZIALE STRUMENTO DI DIAGNOSI DELLE INFEZIONI DA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Bua A<sup>1</sup>., Molicotti P<sup>1</sup>., Delogu G<sup>2</sup>., Mura M.S<sup>3</sup>., Saba F<sup>3</sup>., Pirina P.<sup>4</sup>, Maida I<sup>3</sup>., Madeddu G<sup>3</sup>., Vertuccio C<sup>5</sup>., Sechi L.A<sup>1</sup>., Zanetti S<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Dipartimento Scienze Biomediche, Università di Sassari, <sup>2</sup>Istituto Microbiologia Università Cattolica di Roma, <sup>3</sup>Istituto di Malattie Infettive Università di Sassari, <sup>4</sup>Istituto di Tisiologia e Malattie dell'Apparato Respiratorio Università di Sassari, <sup>5</sup>A.S.L. n°3 Nuoro

La Tuberculosis (TB) è stata definita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), emergenza globale. Il gold standard per lo screening dell'infezione tubercolare è la PPD (Purified Proteine Derivative), ma i suoi diversi limiti richiedono lo sviluppo di sistemi sensibili e specifici per individuare i soggetti venuti a contatto con *Mycobacterium tuberculosis*.

Nel 2001 la Food and Drug Administration ha approvato l'utilizzo di un nuovo test: "QuantIFERON-TB Gold" che misura il rilascio di interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) nel plasma di sangue intero stimolato da antigeni TB specifici (Esat-6 e CFP-10).

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare l'efficacia del QuantIFERON-TB come sistema di diagnosi immunologica di infezione da *M. tuberculosis*.

Nel nostro studio 25 campioni di sangue venoso sono stati divisi in 5 gruppi: 1) n°11 soggetti sani ma con PPD+; 2) n°5 soggetti con infezione recente ed attiva da *M. tuberculosis* in terapia da meno di 30 giorni; 3) n°5 soggetti con sospetto TB; 4) n°2 soggetti vaccinati con BCG da almeno 1 anno nei quali si è osservata una conversione; 5) n°2 soggetti con HIV+.

Tutti i campioni di sangue sono stati saggiati con la metodica del QuantIFERON-TB ottenendo per ogni gruppo i seguenti risultati: I° gruppo 6 campioni positivi e 5 negativi; II° gruppo 4 campioni positivi ed 1 indeterminato; III° gruppo 1 campione positivo, 3 negativi, 1 indeterminato; IV° gruppo 2 campioni negativi; V° gruppo 1 campione negativo ed 1 indeterminato.

I nostri dati indicano che QuantIFERON-TB: 1) discrimina fra soggetti PPD+ sani venuti a contatto con *M. tuberculosis* da quelli PPD+ in seguito a vaccinazione con BCG, in quanto specifico per antigeni del micobatterio tubercolare;

2) potrebbe essere impiegato, con i tradizionali sistemi di diagnosi della TB, nell'individuare soggetti con infezione attiva qualora il loro sistema immunitario non sia troppo compromesso.

Il QuantIFERON-TB potrebbe pertanto rappresentare un essenziale strumento per il controllo della TB contribuendo a migliorare l'accuratezza della diagnosi della malattia tubercolare.

## BATTERIEMIE DA *ACINETOBACTER LWOFFII*: ASPETTI MICROBIOLOGICI E CONSIDERAZIONI CLINICHE

<sup>1</sup>TEGA Luciano, <sup>1</sup>BLANCO Giovanni, <sup>2</sup>OTTAVIANI Donatella, e <sup>1</sup>CARRATURO Antonio

<sup>1</sup> Servizio di Patologia Clinica, P. O. "S. M. Goretti", AUSL Latina

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Ancona

Le specie appartenenti al genere *Acinetobacter* sono ubiquitarie nell'ambiente e negli ultimi anni hanno acquisito un ruolo di primo piano come importanti patogeni nosocomiali.

In particolare, *Acinetobacter lwoffii* che è un costituente della normale flora microbica della pelle, dell'oro-faringe e del perineo, sempre più spesso viene riportato come causa di batteriemia, in particolare in pazienti immunocompromessi.

Abbiamo effettuato uno studio retrospettivo per analizzare le batteriemie causate da *Acinetobacter calcoaceticus* var. *lwoffii* negli ultimi tre anni. Sono stati presi in esame 10 campioni provenienti da pazienti ricoverati nei reparti di Ematologia e Rianimazione dell'Ospedale S. M. Goretti di Latina. Sei campioni provenivano da pazienti portatori di catetere venoso centrale e due da pazienti portatori di catetere urinario. I ceppi di *Acinetobacter lwoffii* isolati hanno mostrato in linea generale una buona sensibilità verso gli antibiotici comunemente utilizzati in terapia, ad eccezione delle cefalosporine che sono risultate costantemente resistenti. Due ceppi hanno mostrato un profilo di antibiotico-resistenza molto elevato. In particolare sono risultati resistenti verso le cefalosporine, amoxicillina/acido clavulanico, piperacillina (MIC >256 mg/ml), tobramicina, levofloxacina, ciprofloxacina. Sono risultati sensibili soltanto: amikacina (MIC 16 mg/ml), gentamicina (MIC 4 mg/ml), imipenem (MIC 4 mg/ml).

I dati riportati in questo studio sono in linea con quelli esistenti in Letteratura circa il ruolo di primo piano occupato dai cateteri quali principali fonti di infezione da *Acinetobacter lwoffii*.

Comunque, a parte alcune eccezioni, i ceppi oggetto di questo studio mostrano una buona sensibilità agli antibiotici, ma è necessario monitorare nel corso degli anni il possibile insorgere di resistenze.

## CMV, EBV E HHV8 NELLE MALATTIE INFIAMMATORIE INTESTINALI

<sup>1</sup> Massimiliano Bergallo, <sup>2</sup> Alessandro Lavagna, <sup>2</sup> Marco Daperno, <sup>1</sup> Chiara Merlino, <sup>1</sup> Sara Baro, <sup>1</sup> Cristina Costa, <sup>1</sup> Francesca Sidoti, <sup>2</sup> Angelo Pera, <sup>1</sup> Rossana Cavallo.

<sup>1</sup> Dip. di Sanità Pubblica e Microbiologia, S.C.D.U. Virologia, Università di Torino;

<sup>2</sup> Divisione di Gastroenterologia, A.S.O. Ordine Mauriziano, Torino

**Introduzione.** L'eziologia delle malattie infiammatorie intestinali (IBD) - m. di Crohn (CD) e rettocolite ulcerosa (UC) - è tuttora sconosciuta. Recentemente è stato ipotizzato il ruolo delle infezioni virali, in particolare da Herpesviridae, nello sviluppo e nel decorso delle IBD. L'infezione da CMV non riconosciuta e non trattata risulta significativamente associata a refrattarietà alla terapia steroidea nell'UC. EBV sembra coinvolto nella patogenesi di una parte dei linfomi non-Hodgkin che si sviluppano nei pazienti con IBD, mentre non sembra significativamente associato allo sviluppo di K rettocolico. Secondo altri autori, invece, EBV e CMV a livello intestinale non rivestirebbero alcun ruolo e sarebbero solo "spettatori innocenti". Non sono tuttora stati effettuati studi sulla prevalenza di infezione da HHV-8 nelle IBD.

**Scopo.** Indagare in modo prospettico la prevalenza di infezione da CMV, EBV e HHV-8 nelle biopsie coliche e nel sangue di pazienti con IBD in fase attiva.

**Materiali e metodi.** Sono stati reclutati 18 pazienti consecutivi con IBD in fase attiva (11 CD, 7 UC) sottoposti a colonscopia. Sono stati prelevati in contemporanea campioni biotici di mucosa colica nelle aree di infiammazione attiva e campioni ematici. È stata effettuata l'estrazione di DNA e RNA ed i geni di CMV, EBV e HHV-8 sono stati ricercati mediante PCR quantitativa-competitiva (QC-PCR). I risultati sono stati correlati con dati clinici, ematochimici e grado di attività di malattia endoscopica (EDA).

**Risultati.** La QC-PCR per CMV era positiva in 2 campioni biotici (1 CD, 1 UC; 11%) e 1 ematico (6%) di un terzo paziente con CD. La QC-PCR per EBV era positiva in 10 campioni biotici (5 CD, 5 UC; 56%, in 3 casi con alta carica virale) e 0 campioni ematici. HHV-8 era negativo in tutti i campioni. Dati clinici, ematochimici ed EDA non differivano significativamente tra casi positivi e negativi.

**Conclusioni.** La localizzazione colica di EBV è frequente sia nella CD sia nell'UC, ma non sembra associata ad infezione sistemica. Il riscontro di CMV sia a livello colico sia ematico è inferiore a quanto precedentemente riportato. Nessuno dei due virus sembra coinvolto nella patogenesi delle complicanze delle IBD, sebbene siano necessari ulteriori studi di follow-up a lungo termine e su una popolazione più ampia. Come atteso, HHV-8 non è stato rilevato in questi pazienti.

## CARATTERIZZAZIONE GENOTIPICA E FENOTIPICA DI CEPPI DI *STREPTOCOCCUS PYOGENES* ERITROMICINA RESISTENTI

del Piano M.<sup>1</sup>, Scazzocchio F.<sup>1</sup>, Berlutti F.<sup>1</sup>, Cipriani P.<sup>1</sup>, Oliva B.<sup>2</sup>, Frascaria P.<sup>3</sup>, Santino I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, Università "La Sapienza", Roma;

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università dell'Aquila, Coppito-67100, L'Aquila;

<sup>3</sup>Ospedale S. Salvatore, Laboratorio Analisi, L'Aquila.

Lo *Streptococcus pyogenes* è il principale responsabile delle patologie infettive delle alte vie respiratorie. La penicillina è ancora considerata il farmaco di scelta nel trattamento di tali infezioni. I macrolidi costituiscono una valida alternativa terapeutica nel caso di pazienti allergici, anche se negli ultimi anni è stato riportato un aumento notevole di ceppi di *S. pyogenes* resistenti all'eritromicina.

Tale resistenza è riconducibile al fenotipo costitutivo (cMLS<sub>b</sub>), a quello inducibile (iMLS<sub>b</sub>) e al fenotipo M. I ceppi con fenotipo cMLS<sub>b</sub> sono resistenti a tutti i macrolidi a 14, 15 e 16 atomi di C, ai lincosamidi ed alle streptogramine, quelli con fenotipo iMLS<sub>b</sub> mostrano uno spettro di resistenza ai macrolidi a 14 e 15 atomi di carbonio ma non necessariamente a quelli a 16, mentre i ceppi con fenotipo M sono caratterizzati da una sensibilità alla clindamicina anche dopo induzione e da una bassa resistenza verso i macrolidi a 14, 15 atomi di C.

La resistenza ai macrolidi è geneticamente determinata da geni appartenenti al gruppo *erm* e dal gene *mefA* che codifica per una pompa di efflusso caratterizzante il fenotipo M.

Nel presente lavoro è stata valutata, in ceppi di *S. pyogenes* di provenienza ospedaliera, la distribuzione dei fenotipi verso i macrolidi a 14, 15 e 16 atomi di C, e la correlazione con i diversi corredi genetici.

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che non tutti i fenotipi riscontrati nei ceppi esaminati sono riconducibili ai tre fenotipi riportati in letteratura. Infatti alcuni ceppi di *S. pyogenes* hanno evidenziato una bassa/media resistenza ai macrolidi a 14 e 15 atomi di C ed anche alla clindamicina, ed una sensibilità a quelli con 16 atomi di C, anche dopo induzione; tale fenotipo è caratterizzato nei ceppi da un profilo genetico simile a quello caratterizzante il fenotipo iMLS<sub>b</sub>.

Questa ulteriore espressione fenotipica, non di tipo inducibile e che potrebbe essere sostenuta da geni non ancora descritti, va ulteriormente investigata.

## CHLAMYDIA PNEUMONIAE E MALATTIA ATROSCLEROTICA CAROTIDEA: ASPETTI CRITICI DELLA PCR

R. Sessa, M. Di Pietro, G. Schiavoni, C. Zagaglia, S. Faccilongo, A. Vitale, G. Cervino, G. Balduino, M. del Piano

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

La *Chlamydia pneumoniae*, batterio patogeno intracellulare obbligato, è nota come agente eziologico delle infezioni del tratto respiratorio quali faringiti, bronchiti e polmoniti.

Negli ultimi anni è stato messo in evidenza il suo coinvolgimento nella patogenesi dell'aterosclerosi e, quindi, nelle malattie cardiovascolari, attraverso studi sierologici, ricerca di DNA di *C. pneumoniae*, studi in vivo e studi di prevenzione secondaria. Per quanto riguarda la ricerca diretta di *C. pneumoniae*, è da tenere presente che a tutt'oggi non esiste un metodo diagnostico standardizzato e convalidato, dal momento che la coltura cellulare presenta una scarsa sensibilità, l'immunocitochimica una scarsa specificità e la microscopia elettronica è considerata una tecnica estremamente sofisticata.

Pertanto la maggior parte degli studi sono stati effettuati mediante ricerca diretta di *C. pneumoniae* ed in particolar modo utilizzando la tecnica di polymerase chain reaction.

Sono stati, quindi, presi in considerazione su MEDLINE, tutti gli studi relativi al coinvolgimento della *C. pneumoniae* nella malattia aterosclerotica carotidea che hanno utilizzato la tecnica di PCR.

Risultano circa 50 studi, pubblicati entro Giugno 2005, in cui la percentuale di positività alla *C. pneumoniae* riscontrata nei campioni di placca aterosclerotica carotidea, e nei campioni di cellule mononucleate del sangue periferico, varia da 0 a 100%. Appare evidente che i risultati sono spesso discordanti e, quindi, di difficile interpretazione, a tal punto che non è stato possibile confrontarne neanche due per le differenze metodologiche di PCR applicate, come, ad esempio, la scelta dei primers, il sistema di rilevazione e di convalida dei risultati positivi.

Pertanto, risulta necessaria una standardizzazione della PCR per la ricerca di *C. pneumoniae* che, allo stato attuale, non permette di ottenere risultati attendibili e riproducibili.

I problemi legati ad una PCR tradizionale potrebbero essere risolti dalla recente introduzione della real-time PCR, tecnica che permette di quantificare la *C. pneumoniae*, fattore estremamente importante per la diagnosi di infezione vascolare.

## VALUTAZIONE MOLECOLARE DELLA RESISTENZA A RIFAMPICINA ED ISONIAZIDE IN STIPI TI PALERMITANI DI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*.

Bonura C., Mammìna C., Immordino R., Platia M.A., Barbaro R., Distefano S., Cascino S., Giammanco A.  
Dipartimento di Igiene e Microbiologia "G. D'Alessandro", Università degli Studi di Palermo.

La tubercolosi rappresenta ancora oggi una delle principali cause di morte nel mondo, con 8 milioni di nuovi casi di malattia e 2 milioni di morti per anno.

Si è assistito nell'ultimo decennio al costante incremento del numero di ceppi di *Mycobacterium tuberculosis* resistenti ai farmaci antitubercolari "in uso" a causa dell'insorgenza di mutazioni puntiformi nei geni che codificano per il bersaglio dei farmaci o per gli enzimi deputati alla loro trasformazione. Sebbene tali ceppi già rappresentino una seria minaccia per il controllo della diffusione della malattia e per l'efficacia degli schemi terapeutici adottati, particolare preoccupazione destano i cosiddetti stipti di *Mycobacterium tuberculosis* multiresistenti (Multi-Drug.-Resistant o MDR) nei confronti di due o più farmaci. È stato dimostrato, infatti, che circa il 90% degli isolati di *Mycobacterium tuberculosis* resistenti alla rifampicina sono anche resistenti all'isoniazide.

Studi genetici hanno evidenziato che il 95-98% dei casi di resistenza alla rifampicina sono associati a mutazioni che insorgono in una porzione di 81 bp (dal codone 507 al codone 533) della regione core di un unico gene, *rpoB*, che codifica per la subunità  $\beta$  dell'RNA polimerasi. I ceppi resistenti all'isoniazide, invece, possono presentare mutazioni in molti geni tra cui *katG*, *inhA*, *oxyR*, *ahpC*, *kasA*, *ndh*, *furA*, così come nella regione intergenica *oxyR-ahpC* e nella regione regolativa a monte dell'operone *mabA-inhA*. La mutazione a livello del codone 315 (Ser) del gene *katG* si ritrova nel 30-65% dei mutanti resistenti all'isoniazide, mentre nei geni *ahpC* e *inhA* le frequenze mutazionali non superano il 10-15%.

Abbiamo anche noi valutato, analizzando le sequenze nucleotidiche del gene *rpoB*, il tipo e la frequenza delle mutazioni correlabili con la resistenza alla rifampicina, in 166 stipti di *Mycobacterium tuberculosis* isolati nel nostro laboratorio. Per verificare, inoltre, se i ceppi resistenti alla rifampicina lo fossero anche all'isoniazide, sono stati sequenziati i geni *katG* e *ahpC*, la regione intergenica *oxyR-ahpC* e la regione regolativa a monte dell'operone *mabA-inhA*.

## FREQUENZA DEGLI ASTROVIRUS IN BAMBINI OSPEDALIZZATI DELL'AREA NAPOLETANA

Maria Grazia Pisciotta<sup>1</sup>, Carmela Moccia<sup>1</sup>, Emiliana Finamore<sup>1</sup>, Aikaterini Kampanaraki<sup>1</sup>, Emilia Galdiero<sup>2</sup>, Francesco Galdiero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Microbiologia e Microbiologia Clinica, SUN; <sup>2</sup>Dipartimento di Fisiologia Generale ed Ambientale, Sezione di Igiene e Microbiologia.

Gli astrovirus umani (HastVs) sono privi di envelope e presentano un genoma ad RNA monocatenario, strutturato in tre open reading frames (ORFs): ORF1a e ORF1b, che codificano rispettivamente per la proteasi e la polimerasi virale e ORF2 che codifica per il precursore del capsido.

Il nostro studio ha valutato la prevalenza delle gastroenteriti virali da astrovirus ed eventuali coinfezioni da rotavirus e adenovirus in bambini di età inferiore a 6 anni ospedalizzati presso diversi presidi napoletani.

Le tecniche di biologia molecolare utilizzate sono l'RT-PCR, per l'identificazione virale, e l'ibridizzazione con Southern Blot di conferma. La tipizzazione è stata effettuata sequenziando i prodotti amplificati con RT-PCR della regione ORF2, che codifica i precursori del capsido virale.

I risultati mostrano che gli astrovirus sono risultati presenti nel 5% dei campioni esaminati (n=23). La RT-PCR ha mostrato che tutti appartenevano al genotipo 1. Il picco di infezione è apparso più evidente nel periodo invernale e tra i bambini di età inferiore ad 1 anno. La più frequente coinfezione è risultata tra astrovirus e rotavirus. Tali osservazioni inducono a supporre che gli astrovirus, trovati nel 5% dei campioni testati per malattie virali e batteriche, si pongono al secondo posto tra le cause più comuni di gastroenterite virale. A scopo preventivo, andrebbe proposto un test biomolecolare soprattutto nei periodi di maggiore infezione per meglio definire il ruolo degli astrovirus nelle gastroenteriti nosocomiali.

## DIAGNOSI VIROLOGICA NELLE AFFEZIONI RESPIRATORIE IN UN DEA PEDIATRICO.

Gentile M., Pierangeli A., Di Marco P., Pagnotti P., Lo Russo L., Tromba V., Midulla F., Moretti C., Antonelli G.

Sez. di Virologia, Dip. di Medicina Sperimentale e Patologia, U.O.C. DEAp, Istituto di Clinica Pediatrica, Università di Roma "La Sapienza".

**Razionale:** I virus respiratori sono tra le cause più comuni di malattie respiratorie. In molti casi, la diagnosi di laboratorio non viene eseguita poiché risulta indaginosa ed a volte di difficile interpretazione.

**Obiettivo:** Studiare l'incidenza delle varie infezioni virali su una popolazione di bambini ricoverati per affezione respiratoria (polmonite, bronchiolite, asma e laringite) presso il DEA pediatrico dell'ospedale Policlinico Umberto I, nel periodo Ottobre 2004 - Luglio 2005.

**Metodo:** I campioni respiratori raccolti in 222 bambini sono stati sottoposti ad analisi molecolari ed isolamento virale su MRC-5, MDCK, Vero e A549. Dopo estrazione dell'acido nucleico, sono state eseguite reazioni di PCR o RT-PCR specifiche per i seguenti virus: adenovirus, virus respiratorio sinciziale (RSV), influenza (Flu) A e B, coronavirus (hCoV), parainfluenzali (PIV) 1, 2 e 3, metapneumovirus (hMPV), e rinovirus. Contestualmente il campione è stato esaminato per la presenza di altri microrganismi.

**Risultati e conclusioni:** Sono stati sottoposti ad isolamento virale ed a PCR 150 campioni, 67 (44.6%) sono risultati positivi all'isolamento virale e 68 (45.3%) positivi per virus respiratori alla PCR. Sono stati saggiati, esclusivamente per PCR, ulteriori 72 campioni per un totale di 222 (210 lavaggi nasali, 11 tracheoaspirati, 1 espettorato) di cui 98 sono risultati positivi (44.1%). Specificamente essi sono risultati positivi per: RSV (38.7%); rinovirus (22.4%); PIV-3 (19.3%); Flu A o B (11.2%); hMPV (8.1%); hCoV (6.1%) e adenovirus (5.1%). Sono state identificate 10 infezioni miste (10.2%). Non sono ancora disponibili i dati che riguardano l'identificazione degli altri microrganismi. Sulla base dei dati clinici, si possono fare alcune considerazioni. Il virus RSV è il maggior responsabile delle infezioni respiratorie ad eziologia virale, mentre i rinovirus sembrano ricoprire un ruolo relativamente importante anche in infezioni delle basse vie respiratorie (polmoniti e bronchioliti) ed in episodi di attacco asmatico. HCoV e HMPV svolgono un ruolo significativo nelle infezioni del tratto respiratorio inferiore mentre il significato eziopatogenico delle infezioni miste deve essere ancora chiarito. La PCR si dimostra la tecnica più rapida ed efficace per la tipizzazione virale rispetto all'isolamento virale che, pur essendo un metodo sensibile, non permette l'identificazione rapida dei virus.

## IMPLICAZIONE DEL SISTEMA DI EFFLUSSO MexAB-OprM NELLA RESISTENZA ALL'IMIPENEM IN ISOLATI CLINICI DI PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Koncan Raffaella, Oliosio Debora, Giuseppe Cornaglia, Roberta Fontana e Annarita Mazzariol

Dipartimento di Patologia, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Verona

Il fenotipo caratterizzato da resistenza ai carbapenemici e sensibilità a ceftazidime riscontrato con sempre maggiore frequenza in *Pseudomonas aeruginosa* è stato fino ad ora imputato all'iperproduzione di beta-lattamasi di tipo AmpC, più facilmente inducibile dai carbapenemici che dal ceftazidime. Per verificare tale ipotesi e per valutare l'eventuale responsabilità dei sistemi di efflusso attivo in questo particolare fenotipo di resistenza, 30 ceppi di *P. aeruginosa* resistenti ad imipenem e meropenem e sensibili al ceftazidime sono stati raccolti e analizzati. I test di sensibilità hanno confermato in tutti i ceppi la resistenza all'imipenem con una diminuzione significativa della MIC in presenza dell'inibitore delle pompe di efflusso fenil-arginina-beta-naftalamide. Tutti i ceppi sono risultati negativi alla ricerca dell'attività carbapenemasi, valutata mediante saggio spettrofotometrico, sia in presenza sia in assenza di imipenem, e negativi alla ricerca della porina D mediante SDS-Page. L'induzione di AmpC è stata invece confermata in tutti i ceppi dall'aumento della velocità di idrolisi della cefaloridina.

Il sequenziamento del gene *mexR* e della regione intergenica *merR-mexA*, ha messo in evidenza o una mutazione aminoacidica nella sequenza del gene *mexR* in 20 ceppi, soppressore dell'espressione genica del sistema MexAB-OprM, o una mutazione nello spazio intergenico tra *mexR* e *mexA* in 10 ceppi, mutazioni che possono essere responsabili dell'iperespressione del sistema di efflusso MexAB-OprM. L'iperespressione di questo sistema è stata confermata sia mediante western blot, utilizzando anticorpi anti MexB, sia mediante RealTime PCR dopo retrotrascrizione dell'mRNA, nei confronti del gene *mexB*, comparato con il gene costitutivo di controllo *rplS*.

I nostri risultati suggeriscono che l'iperespressione della beta-lattamasi AmpC non può essere considerata il solo fattore responsabile della resistenza all'imipenem ma anche l'iperespressione del sistema di efflusso MexAB-OprM è un fattore che entra in gioco in questo particolare fenotipo.

## **METODICHE CONVENZIONALI E MOLECOLARI PER LA VALUTAZIONE DI CARATTERI FENOTIPICI E GENOTIPICI COINVOLTI NELLA PRODUZIONE DI SLIME DA PARTE DI STAFILOCOCCI COAGULASI NEGATIVI**

Liberto MC, Bontempo L, Quirino A, Lamberti AG, Capicotto R, Puccio R, Barreca GS, Focà A  
*Cattedra di Microbiologia, Università degli Studi di Catanzaro "Magna Graecia"*

*Slime* è una sostanza extracellulare mucoide ricca di glicosamminoglicani tendenti a formare un biofilm che, se da una parte media l'adesione delle cellule batteriche a cateteri e biomateriali utilizzati come impianti protesici, dall'altra provoca fenomeni di resistenza agli antibiotici.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di verificare la corrispondenza tra la produzione di slime da parte di stafilococchi e la presenza e co-espressione dei geni *icaA* e *icaD* (appartenenti all'operone *ica*) responsabili della sua sintesi. A tal proposito sono stati saggiati 30 ceppi di stafilococco isolati da diversi campioni clinici tra cui emocolture, tamponi ferita, tubi drenaggio e cateteri venosi centrali. L'aspetto fenotipico è stato messo in evidenza mediante test di Christensen e Congo Red Agar plate test; la presenza e l'espressione dei geni *icaA* e *icaD* è stata rilevata mediante PCR Real-Time, utilizzando il sistema LightCycler ed applicando un protocollo sperimentale da noi messo a punto. Nell'80% dei ceppi testati è stato possibile osservare una piena concordanza tra espressione fenotipica e presenza dei geni responsabili di tale espressione, nel 20% dei casi discordanza. Di questi ultimi, nel 10% si evidenziava la presenza dei geni *icaA* e *icaD*, ed assenza dell'espressione fenotipica; nell'8% presenza del gene *icaA*, assenza del gene *icaD* e presenza dell'espressione fenotipica; il 2% assenza dei geni *icaA* e *icaD* e presenza dell'espressione fenotipica. È stata valutata inoltre l'espressione dei geni *icaA* e *icaD*, attraverso la determinazione degli mRNA, in quei ceppi in cui alla presenza dei suddetti geni non era associata l'espressione fenotipica. In 4 casi su 5 non vi era co-espressione dei geni, mentre in 1 caso su 5 è stato possibile rilevare entrambi i trascritti in assenza di fenotipo. Dall'analisi complessiva dei dati si evidenzia che lo studio dei ceppi di stafilococco in grado di esprimere capacità di formare biofilm e di produrre slime presenta attualmente ancora delle difficoltà, sia per la soggettività d'interpretazione dei metodi fenotipici usati, sia per la probabilità che i geni implicati possano subire delle regolazioni a diversi livelli, tali da impedire una correlazione lineare tra la loro presenza e l'espressione fenotipica.

## **VALUTAZIONE COMPARATIVA DI METODICHE MOLECOLARI PER LA DETERMINAZIONE DI PAPPILLOMAVIRUS (HPV) IN CAMPIONI CLINICI**

A. Siddu, S. Marchetti, R. Graffeo, S. Manzara, R. Santangelo, P. Cattani e G. Fadda  
*Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*

Le infezioni da Papillomavirus (HPV) costituiscono una delle più frequenti infezioni virali a trasmissione sessuale e sono considerate un importante fattore di rischio per lo sviluppo di carcinoma della cervice. La persistenza dell'infezione è generalmente associata ad un aumento del rischio di trasformazione cellulare indotta da HPV, ed è generalmente indicata da una persistente determinazione del DNA virale.

Il valore predittivo del rischio di evoluzione maligna di una determinazione positiva per DNA di HPV è però relativamente basso in quanto molte delle lesioni da HPV "ad alto rischio" regrediscono naturalmente ad opera della risposta immunitaria dell'ospite. Per stabilire la persistenza dell'infezione è inoltre necessario escludere la frequente possibilità di una nuova infezione, valutando la presenza dello specifico genotipo.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare due metodiche attualmente utilizzate per la ricerca di HPV mettendo a confronto la determinazione del DNA virale mediante una ibridizzazione a cattura (HC2 HPV-DNA test, Digene) con una reazione di amplificazione (Multiplex PCR) tipo specifica (HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33) messa a punto nel nostro Istituto. Con la prima metodica vengono identificati i due gruppi di genotipi "basso" ed "alto rischio", con la PCR si identifica lo specifico genotipo presente nel campione in esame.

Sono stati esaminati 222 prelievi cervicali ottenuti da pazienti afferenti all'ambulatorio dell'Istituto di Microbiologia del Policlinico Universitario "A. Gemelli", Roma, per indagini microbiologiche del tratto genitale. Ciascun campione è stato esaminato in parallelo con le due metodiche in studio.

Dei 222 campioni analizzati mediante ibridizzazione, 87 (39,1%) sono risultati positivi per DNA di HPV; gli stessi campioni saggiati mediante multiplex PCR hanno mostrato un risultato positivo nel 43,2% (96/222) dei casi. Una concordanza è stata riscontrata nel 71,6% dei casi (positivi e negativi). Le discordanze, osservate nel 28,4% delle determinazioni, sono riferibili al differente approccio metodologico utilizzato e saranno discusse nel presente lavoro.

Complessivamente, le metodiche si sono rivelate entrambe sensibili e specifiche anche se la loro applicazione potrebbe essere differenziata in base al tipo di approccio clinico.

## DETERMINAZIONE DEL DNA DI HHV-8 IN LEUCOCITI DI PAZIENTI CARDIOVASCOLARI

A.Ingianni\*, F.Carta\*, C.Lai°, A. Reina^, A. Desogus\*, M.A. Madeddu\*, R.Pompei\*

\*Dip. Scienze e Tecnologie Biomediche, Sez. di Microbiologia Applicata e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi di Cagliari. °Divisione di Cardiologia UTIC, Ospedale S.S.Trinità di Cagliari, ^Servizio di Immunoematologia, Ospedale Brotzu di Cagliari.

L'Herpesvirus umano di tipo 8 (HHV-8) membro della sottofamiglia delle Gammaerpesvirinae è stato associato a tutte le forme del sarcoma di Kaposi, alla malattia multicentrica di Castleman, a linfomi diffusi (PEL) e a linfomi primitivi della cavità sierosa (BCBL). HHV-8 ha un tropismo specifico nei confronti di linfociti e cellule endoteliali, è altamente cancerogeno in adulti immunocompromessi e in individui affetti da HIV; finora non sono ancora stati chiariti il meccanismo di passaggio da infezione latente a manifestazione clinica e la modalità di trasmissione.

Negli ultimi anni si è rilevata un'aumentata presenza di HHV-8 nella popolazione in generale ed in particolare in alcune aree geografiche come l'Italia meridionale, la Sicilia, la Sardegna e la valle del Po; è possibile che pressioni genetiche date da malattie endemiche (per es. malaria, G6PD carenza, talassemia) possano avere selezionato una popolazione con accresciuta suscettibilità al virus HHV-8.

Alcuni autori ipotizzano che certi agenti infettanti, tra cui gli herpesvirus, possano essere interessati allo sviluppo di placche ateromatose, in particolare questa teoria è sostenuta dalla caratteristica di HHV-8 di replicarsi e danneggiare le cellule endoteliali. In questo studio si intende verificare una possibile relazione tra infezione da HHV-8 e affezioni cardio-vascolari nel Sud Sardegna. A tale scopo è stata determinata la presenza del DNA di HHV-8, mediante PCR, nei leucociti del sangue periferico di pazienti pervenuti alla Divisione Cardiologia UTIC dell'ospedale S.S.Trinità di Cagliari. Finora sono stati analizzati 180 pazienti (127 maschi, 53 femmine) che sono stati suddivisi in 4 classi di patologie cardiache valutate in base agli accertamenti effettuati: SCA (sindrome coronarica acuta), SCNA (sindrome coronarica non acuta), SNCA (sindrome non coronarica acuta) e SNCNA (sindrome non coronarica non acuta). I controlli sono stati eseguiti su donatori di sangue del Servizio di Immunoematologia dell'Ospedale Brotzu di Cagliari.

I dati preliminari indicano che la frequenza di identificazione del HHV-8 DNA è significativamente più elevata nei campioni dei pazienti cardiologici (22%) rispetto ai controlli dei soggetti sani. Viene effettuata una valutazione critica del possibile ruolo di HHV-8 nelle patologie cardiovascolari.

## PREVALENZA DI CEPPI DI *NEISSERIA MENINGITIDIS* DI SIEROGRUPPO C CON FENOTIPO A DIMINUITA SENSIBILITA' ALLA PENICILLINA

Paola Mastrantonio, Cecilia Fazio, Arianna Neri, Tonino Sofia, Paola Stefanelli.

Istituto Superiore di Sanità', Dipartimento Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Roma.

In Italia l'incidenza di meningite meningococcica è circa 0.3-0.4/100.000 abitanti. Negli anni '90 i ceppi di meningococco appartenenti al sierogruppo C rappresentavano meno del 25% di tutti gli isolati clinici. Dal 2002 si è osservato un aumento di casi di meningite meningococcica dovuti a ceppi appartenenti al sierogruppo C, attualmente responsabili di oltre il 50% dei casi confermati da coltura. Parallelamente, si è verificato un aumento dei ceppi appartenenti a questo sierogruppo con diminuita sensibilità alla penicillina, penI (0.06 > MIC < 1 mg/ml).

Tutti i ceppi ricevuti nell'ambito della sorveglianza nazionale sono stati caratterizzati per fenotipo e genotipo. Oltre al metodo di sensibilità alla penicillina mediante E-test è stato utilizzato un saggio in real-time PCR, già messo a punto dagli autori, per discriminare tra ceppi sensibili o intermedi. L'analisi di sequenza del gene *penA* è stata inoltre utilizzata per caratterizzare il mosaicismismo del gene. Per stabilire l'appartenenza dei ceppi a specifici lineages, è stata effettuata un'analisi molecolare mediante la MultiLocusSequenceTyping (<http://neisseria.org/nm/typing/mlst>).

Nel 2002-2003, il fenotipo prevalente C:2b:P1.5, appartenente a due diversi lineages (ST8/A4, ST1860/ET37) rappresentava più del 45% di tutti i meningococchi di gruppo C; nel 2004 si è avuto un improvviso cambiamento ed il fenotipo C:2b:P1.5,2 (ST8/A4) è divenuto il più diffuso (50%). Negli anni precedenti al 2002 solo il 3% dei ceppi risultava essere intermedio alla penicillina per poi aumentare al 43% nel 2002, al 51% nel 2003 e all'83% nel 2004-2005. Tutti i ceppi appartenenti al fenotipo C:2b:P1.5,2 intermedi alla penicillina risultano essere clonali, con lo stesso mosaicismismo nel gene *penA*. L'aumento negli ultimi anni dei ceppi di *N.meningitidis* di gruppo C si è tradotto in un frequente cambio delle caratteristiche molecolari dei ceppi soprattutto per quanto riguarda l'espressione delle proteine di membrana che definiscono il fenotipo (sierotipo e sottotipo) ed in una prevalente circolazione di ceppi a diminuita sensibilità alla penicillina.

## QUANTIFICAZIONE MEDIANTE PCR DELL'EBV-DNA DA BIOPSIE CUTANEE DI PAZIENTI CON CTCL (MICOSI FUNGOIDE E SINDROME DI SEZARY)

C. Merlino, M. Bergallo, C. Costa, M. Novelli\*, R. Ponti\*, M.T. Fierro\*, R. Cavallo, M.G. Bernengo\*, A. Negro Ponzi  
*Dip. Sanità Pubbl. e Microbiol., Lab.Virologia, \* Dip. Scienze Biom. Oncol. Umana, Sez. Dermatol., Lab. Immunopatol. Cutanea; Università di Torino*

**Introduzione.** La micosi fungoide (MF) è il più frequente linfoma primitivo cutaneo a cellule T (CTCL) epidermotropo, generalmente confinato alla cute e con andamento clinico spesso indolente, mentre la sindrome di Sezary (SS), è un CTCL sistemico con prognosi nettamente peggiore. Per la loro eziopatogenesi, ancora ignota, sono stati suggeriti fattori genetici, ambientali e infettivi. Recentemente retrovirus come HTLV-I e herpesvirus umani sono stati coinvolti sia per la loro potenzialità di trasformazione oncogena diretta, sia perché capaci di infettare le cellule T e stabilire uno stato di latenza nei tessuti dell'ospite. Alcuni studi molecolari sul ruolo del virus di Epstein-Barr (EBV) nell'eziopatogenesi dei CTCL, hanno portato a risultati controversi anche a causa della diversa sensibilità delle tecniche impiegate.

**Metodi.** In questo lavoro è stata indagata retrospettivamente la presenza e l'eventuale carica virale di EBV in biopsie cutanee di pazienti con MF e SS utilizzando una PCR quantitativa-competitiva (QC-PCR) altamente sensibile (1-10 copie di EBV-DNA/reazione) messa a punto nel Laboratorio di Virologia. Tale metodica prevede la costruzione di una curva di taratura mediante l'utilizzo di uno standard esterno, un controllo interno di amplificazione, e l'analisi densitometrica delle bande di amplificazione. Sono stati utilizzati campioni congelati, di DNA di 17 pazienti con MF (11 M, 6 F; età mediana 63 anni, range 14-84), 4 con MF evoluta in linfoma ad alto grado (2 M, 2 F, età mediana 74 anni, range 59-82), 10 con SS (3 M, 7 F, età mediana 72 anni, range 46-84). Tutti i casi di MF e SS presentavano un riarrangiamento clonale dei geni del T Cell Receptor (TCR) catena  $\gamma$ . Come controllo sono stati esaminati i campioni di 8 pazienti con dermatosi cutanee reattive (4 M, 4 F, età mediana 64,5, range 33-79).

**Risultati.** Nessuno dei 21 pazienti con MF è risultato positivo per EBV-DNA. Nella SS, invece, erano positivi per EBV-DNA 7 pazienti su 10 (70%) con una carica media di 313,4 copie genomiche/ $\mu$ g di DNA estratto (range 1-2160 copie). In nessun paziente del gruppo di controllo è stata riscontrata la presenza di EBV-DNA.

**Conclusioni.** Nella nostra casistica appare una differenza altamente significativa tra MF e SS per quanto riguarda la positività per EBV-DNA nelle biopsie cutanee. Le differenze con i dati della letteratura, soprattutto per la MF, sono da valutare dal punto di vista delle tecniche impiegate. L'elevata percentuale di positività per EBV-DNA da noi riscontrata nella SS conforta i dati di letteratura che suggeriscono la rilevanza prognostica del riscontro del genoma di EBV nella cute, probabilmente correlato con un marcato deficit immunitario nel corso di forme severe di SS.

## METODO DI DIFFUSIONE IN AGAR PER LA VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITA' DI CANDIDA SPP. ALLA CASPOFUNGINA

M.E. Milici<sup>1</sup>, C.M. Maida<sup>1</sup>, G. Incannella<sup>1</sup>, S. Oliveri<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Igiene e Microbiologia – Sezione di Microbiologia, Università di Palermo

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Ginecologiche e Microbiologiche, Università di Catania

Per l'esecuzione del test di diffusione in agar sono stati saggiati 75 isolati clinici di lievito da micosi profonde e sono state valutate differenti concentrazioni di caspofungina. I saggi di sensibilità in vitro sono stati effettuati con la metodica di riferimento (micrometodo di diluizione in brodo NCCLS M27-A2) e con la diffusione in agar eseguita in Mueller Hinton agar con aggiunta di blue di metilene al 2%.

I saggi effettuati con la metodica di riferimento hanno previsto l'utilizzo di piastre microtitre da 96 pozzetti con l'aggiunta del farmaco con concentrazioni comprese tra 0,0015 a 8  $\mu$ g/ml. Su ogni micropiastra è stato saggiato il farmaco su 8 ceppi in doppio. La lettura dei risultati (MIC<sub>90</sub>) è stata effettuata dopo 24 e 48 ore di incubazione a 35°C.

Per la diffusione in agar sono stati preparati in laboratorio dischetti bianchi di 6 mm (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md.) contenenti concentrazioni finali di caspofungina rispettivamente di 2, 10 e 25  $\mu$ g/ml. Dopo 24 e 48 ore di incubazione a 35°C è stato misurato il diametro di inibizione completa della crescita attorno al dischetto, ed i risultati sono stati comparati con quelli del micrometodo di riferimento.

In linea generale, a valori di MIC  $\leq$  1  $\mu$ g/mL corrispondevano valori medi di diametro di inibizione di 13,57 per dischetti di 2  $\mu$ g/mL, di 20,97 mm di media per dischetti di 10  $\mu$ g/mL, e di 23,33 mm di media per dischetti di 25  $\mu$ g/mL di caspofungina.

Per i lieviti con una MIC  $\geq$  2  $\mu$ g/mL corrispondevano diametri medi di inibizione di 11,40 mm per dischetti contenenti 2  $\mu$ g/mL, di 20,43 mm di media per dischetti contenenti 10  $\mu$ g/mL, e di 23,31 mm di media per dischetti contenenti 25  $\mu$ g/mL.

In conclusione, per la maggior parte dei ceppi saggiati (93,7%), i risultati della diffusione in agar sono stati omogenei con quelli ottenuti con il metodo di riferimento, solamente per un numero esiguo di ceppi (6,3%) non si è evidenziata corrispondenza tra i due metodi.

## ATTIVITÀ “IN VITRO” DI LINEZOLID NEI CONFRONTI DI CEPPI DI MICOBATTERI TUBERCOLARI E NON DI ISOLAMENTO CLINICO.

Paola Molicotti, Silvia Ortu, Sara Cannas, Donatella Usai, Leonardo A. Sechi, Stefania Zanetti

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

Il Linezolid (Pfeizer) appartiene ad una nuova classe di antimicrobici, gli ossazolidinoni, la cui azione è quella di inibire la sintesi proteica legandosi alla subunità ribosomiale 50S.

Per questo farmaco è stata già descritta in letteratura la sua attività nei confronti di Gram-positivi, incluso lo *S. aureus* resistente alla meticillina ed agli *Enterococchi* resistenti alla vancomicina, inoltre sembrerebbe avere anche una buona attività “in vitro” nei confronti di *M. tuberculosis* e *MOTT*.

Per tale motivo abbiamo voluto saggiare l’attività “in vitro” del Linezolid sia nei confronti di 24 ceppi clinici di *M. tuberculosis* variabilmente resistenti ai farmaci antitubercolari e dell’ATCC 24294 (H37 Rv) ma anche nei confronti di 19 ceppi clinici di Micobatteri non tubercolari.

A tale scopo, è stato eseguito il saggio di sensibilità con il Metodo Proporzionale, che ha mostrato un’ottima attività del farmaco soprattutto nei confronti dei ceppi di MTB resistenti a uno e a due farmaci di prima linea, con valori di MIC comprese tra 0,5 e 1 µg/ml, mentre nei confronti delle altre specie di micobatteri, una buona attività c’è stata nei confronti del *M. gordonae*, *M. phlei*, *M. marinum*, *M. aurum*, *M. phlei* e *M. avium* (0,5 e 2 µg/ml).

I dati ottenuti incoraggiano ad un uso di questo farmaco come alternativa nella terapia delle infezioni causate da micobatteri tubercolari e non, sebbene siano necessarie eseguire ulteriori valutazioni cliniche.

## SUSCETTIBILITÀ ANTIMICROBICA DI BATTERI ISOLATI DA CAVALLE IPOFERTILI.

R. Frontoso, L. De Martino, \*M.P. Pasolini, \*A. Potena, U. Pagnini, G. Iovane.

Dip. Patologia e Sanità Animale, \*Dip. Scienze Cliniche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Napoli “Federico II”.

Le infezioni uterine sono state riconosciute a lungo come una delle principali cause di ridotta fertilità nelle cavalle, spesso causate da microrganismi opportunisti ed una varietà di specie batteriche sono state isolate. Visto che negli ultimi decenni, l’ampio utilizzo degli antibiotici ha portato alla comparsa e alla diffusione di microrganismi resistenti verso una o più sostanze antibatteriche, abbiamo condotto un’indagine batteriologica su tamponi cervico-uterini in cavalle ipofertili e valutato la suscettibilità antimicrobica degli isolati batterici. Lo studio è stato condotto in Campania in una stazione di monta e di fecondazione artificiale nella primavera-estate 1998-2004. Il prelievo veniva effettuato a cavalle ipofertili con tamponi (Equi -Vet<sup>R</sup>), provvisti di appositi dispositivi con estremità terminale protetta, trasportati in laboratorio in terreno Amies a temperatura di refrigerazione ed esaminati entro 24 ore.

I campioni sono stati prelevati da 586 fattrici e 287 (49.0%) di essi risultavano essere positivi alle indagini batteriologiche. Complessivamente sono stati isolati 347 ceppi batterici, e precisamente identificati: *Strept. gruppo C* (31.7%), *E. coli* (18.4%), *Strept. spp* (8.1%), *Staph. aureus* (7.5%), *Enterobacteriaceae* (5.2%), *P. aeruginosa* (4.0%), *Bacillus spp.* (3.2%), *E. coli emolitico* (1.2%), *Staph. coagulase+* (1.2%), *Staph. coagulase-* (0.9%), ed in misura minore altre specie batteriche.

Gli isolati sono stati testati per la resistenza a 21 antibiotici secondo la metodica di Kirby-Bauer. Tutti i ceppi isolati mostravano resistenza da 8 a 12 antibiotici, e precisamente *Strept. gruppo C* mostrava una marcata resistenza a: kanamicina, gentamicina, apramicina, neomicina, ossitetraciclina, tetraciclina, flumequina, lincomicina, sulfametossazolo + trimetoprim. In generale lo *Strept. equi subspecie equi* era il ceppo batterico più resistente, mentre lo *Staph. aureus* era quello più sensibile. Tra i 64 *E. coli* isolati la resistenza era molto comune alla penicillina G, ampicillina, amoxicillina, eritromicina, tilosina, spiramicina, lincomicina, rifampicina. In comparazione con altri paesi, i nostri dati hanno rilevato differenze nei profili di suscettibilità batterica ai chemioterapici. Data l’impossibilità di sviluppare protocolli terapeutici uniformi e costanti nel trattamento delle infezioni uterine, è necessario ricorrere di routine ai test di antibiotico-resistenza, comunque utili a rafforzare i sistemi di sorveglianza della resistenza antimicrobica.

## UTILIZZAZIONE DELLA PCR PER LA DIAGNOSI DI ZIGOMICOSI

Drago M, Sisto F, Scaltrito MM, e Morace G  
Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Milano

Le zigomicosi sono infezioni fungine invasive gravi ad evoluzione fatale nell'ospite immunocompromesso. Gli agenti eziologici, ubiquitari e spesso comuni contaminanti ambientali, appartengono all'ordine *Mucorales* della divisione *Zygomycetes* e sono caratterizzati da rapida crescita ed angioinvasività con conseguente progressiva e rapida necrosi dei tessuti infettati. Inoltre, la quasi totalità delle specie presenta *in vitro* resistenza alla maggior parte degli antifungini sistemici disponibili, correlandosi, peraltro, al frequente riscontro di fallimento terapeutico. La diagnosi convenzionale è resa difficoltosa dall'ubiquitarità degli agenti (necessità di dimostrazione istologica del parassitismo fungino) e dall'impossibilità, spesso, di ottenere prelievi o campioni biotipici significativi. La diagnosi molecolare potrebbe rappresentare una valida alternativa, soprattutto quando non sia possibile effettuare indagini colturali. Recentemente, siamo stati richiesti di accertare in preparati istologici (vetrini non colorati) la presenza di DNA appartenente a zigomiceti, il cui parassitismo tessutale era stato riscontrato utilizzando colorazioni istologiche specifiche per i funghi. A tale scopo, abbiamo utilizzato due set di primers, uno di questi è quello comunemente usato per la panfungal PCR ed è disegnato nelle regioni ITS (*internal transcribed spacer*) dell'rDNA 18S (ITS1) e 28S (ITS4), l'altro, specifico per zigomiceti e disegnato sempre nelle regioni ITS dell'rDNA 5.8S, è stato estrapolato da dati della letteratura (AEM 2001, 67:4479). Tali coppie di primers sono state utilizzate per l'amplificazione di DNA estratto da: campione clinico, colture di *Mucor* sp, *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans* e cellule umane (HeLa e cellule muscolari) come controllo. Entrambi i set hanno amplificato il DNA fungino, mentre DNA umano (cellule di controllo e campione clinico) è stato amplificato solo con il secondo set di primers, rendendo tale set inutilizzabile per la diagnosi di zigomicosi direttamente da campioni clinici, in quanto la banda dell'amplificato presentava una lunghezza molto vicina a quella ottenuta dai funghi. La negatività del campione clinico con i primer della panfungal PCR è, secondo noi, ascrivibile alla bassa carica fungina presente nel campione.

Lavoro eseguito nell'ambito del progetto PRIN 2003-2004 (no. 2003062784)

## ANTIBIOTICO-RESISTENZA ED EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DI 55 CEPPI INVASIVI DI *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ISOLATI IN DUE OSPEDALI LOMBARDI

Rosario Musumeci<sup>1</sup>, Anna Maria Laura Careddu<sup>1</sup>, Francesco Broccolo<sup>1</sup>, Simone Bramati<sup>2</sup>, Antonio Goglio<sup>3</sup>, Clementina Cocuzza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Clinica, Prevenzione e Biotecnologie Sanitarie – Università di Milano-Bicocca

<sup>2</sup>Laboratorio di Microbiologia – Ospedale S. Gerardo, Monza

<sup>3</sup>Unità Operativa di Microbiologia e Virologia - Ospedali riuniti di Bergamo

*Streptococcus pneumoniae* è uno tra i maggiori agenti causali di alcune tra le più gravi malattie infettive. L'emergenza mondiale dell'antibiotico-resistenza di questa specie ha recentemente richiesto strategie alternative come la terapia con vancomicina nella meningiti, la terapia con fluorochinoloni nelle infezioni delle basse vie del tratto respiratorio e programmi di vaccinazione su vasta scala. In Italia l'incidenza di eritromicina-resistenza in ceppi di *S. pneumoniae* invasivi nel triennio 2001-2003 è stata del 35%.

In questo studio riportiamo l'incidenza dell'antibiotico-resistenza, la distribuzione dei sierotipi e l'epidemiologia molecolare di 55 ceppi di pneumococchi invasivi di recente isolamento nella regione Lombardia.

I ceppi di *S. pneumoniae* invasivi sono stati isolati da pazienti ospedalizzati e di questi sono state valutate le MIC di penicillina, amoxicillina, cefaclor, ceftriaxone, cefuroxime, tetracicline, clindamicina, eritromicina, azitromicina, claritromicina, josamicina, levofloxacina, norfloxacina, ciprofloxacina e prulifloxacina seguendo le indicazioni del CLSI.

Tra i 55 ceppi saggiati, 19 (34,5%) sono risultati eritromicina-resistenti. La valutazione dei meccanismi di eritromicina-resistenza è stata eseguita mediante la tecnica PCR per i geni *erm(B)* e *mef(A)* e tra i ceppi studiati il meccanismo maggiormente rappresentato è risultato essere quello correlato alla presenza del gene *mef(A)*.

L'analisi PFGE, eseguita sui ceppi eritromicina-resistenti utilizzando come enzima lo SmaI, ha permesso di evidenziare, tra questi ceppi, diversi profili di restrizione. La valutazione di tali profili è stata effettuata comparando tali profili al pannello di cloni riconosciuti dal Pneumococcal Molecular Epidemiology Network.

Da questo studio si evince una distribuzione, nella microarea presa in esame, di ceppi invasivi di *S. pneumoniae* che mostrano antibiotico-resistenza per i macrolidi dovuta quasi esclusivamente alla presenza della pompa d'efflusso *mef(A)*. Tale risultato va in controtendenza rispetto al trend italiano che vede ancora oggi come meccanismo di resistenza maggiormente rappresentato quello dovuto alla presenza del gene *erm(B)*.

## CONFRONTO TRA SEI METODI DI ESTRAZIONE DEL DNA VIRALE DA URINE E SIERO

Massimiliano Bergallo, Cristina Costa, Giorgio Gribaudo, Daniele Roberta, Federica Piana, Sonia Tarallo, Sara Baro, Alessandro Negro Ponzi, Rossana Cavallo.

Dip. di Sanità Pubblica e Microbiologia, S.C.D.U. Virologia, Università di Torino

**Introduzione.** L'utilizzo di un efficiente metodo di estrazione e purificazione del DNA è fondamentale per ottenere risultati affidabili mediante PCR sia nell'ambito della diagnostica che della ricerca. Infatti, uno dei principali limiti della PCR è l'inibizione dell'amplificazione da parte di sostanze eventualmente presenti.

**Scopo.** Confrontare sei diversi metodi di estrazione del DNA in termini di percentuale di recupero e purezza del DNA e capacità di prevenire l'inibizione dell'amplificazione.

**Materiali e metodi.** A 10 campioni di urine e siero – precedentemente risultati negativi per BKV-DNA ad una nested-PCR specifica per l'amplificazione del Large T antigen- è stata aggiunta una quantità nota di pBKV (400 ng). Ogni campione è stato sottoposto ad estrazione in quintuplicato per un totale di 50 procedure di estrazione da urine e 50 da siero. Sono stati posti a confronto i seguenti protocolli di estrazione: A, kit di estrazione Extragen (Amplimedical); B, estrazione con tampone di lisi associato a coagulazione delle proteine mediante bollitura; C, estrazione con il solo tampone di lisi; D, estrazione con fenolo/cloroformio seguita da precipitazione con etanolo; E, metodo di Boom (silica gel); F, estrazione con lisi mediante digestione enzimatica con proteinasi K. I sei protocolli di estrazione sono stati confrontati in base a: 1) efficienza di recupero (percentuale di recupero di pBKV rispetto ai 400 ng iniziali, determinata mediante spettrofotometro); 2) purezza del DNA estratto (mediante lettura spettrofotometrica del rapporto di assorbanza 260/280 nm); 3) presenza di inibitori (in base alla negatività della nested PCR).

### Risultati.

Protocollo	Quantità di DNA recuperata			% di recupero			R 260/280 medio		% di inibizione
	u	s	u	s	u	s	u	s	
A	324 ± 15	306 ± 93.5	81 ± 3.76	76.5 ± 22.5	1.54	1.67	0 (0/50)	0 (0/50)	
B	292 ± 64	290 ± 95.2	73 ± 16	72.5 ± 23.8	1.45	1.63	0 (0/50)	0 (0/50)	
C	330 ± 37.4	268 ± 76.9	82.5 ± 9.35	67 ± 17.5	1.57	0.69	0 (0/50)	18 (9/50)	
D	350 ± 46.9	302 ± 60	87.5 ± 11.7	75.5 ± 14.9	1.57	1.73	0 (0/50)	0 (0/50)	
E	344 ± 19.7	307 ± 67.7	86 ± 4.9	76.6 ± 16.9	1.58	1.53	0 (0/50)	0 (0/50)	
F	348 ± 40	306 ± 58.5	87 ± 10	76.5 ± 14.6	1.19	0.95	0 (0/50)	14 (7/50)	

**Conclusioni.** I metodi di estrazione del DNA valutati hanno evidenziato diverse performance in termini di percentuale di recupero e purezza del DNA e capacità di prevenire l'inibizione dell'amplificazione. La scelta del metodo di estrazione sembra quindi legata ai requisiti del DNA per l'utilizzo successivo.

## CARATTERISTICHE DI VIRULENZA DI ENTEROCOCCHI *vanA* DI ORIGINE UMANA, ANIMALE E ALIMENTARE.

C. Paoletti<sup>1</sup>, G. Foglia<sup>1</sup>, E. Guaglianone<sup>2</sup>, G. Magi<sup>1</sup>, C. Pruzzo<sup>1</sup>, F. Biavasco<sup>1</sup>, B. Facinelli<sup>1</sup>, G. Donelli<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Istituto di Microbiologia e Scienze Biomediche, Università Politecnica delle Marche, Ancona; <sup>2</sup>Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

ARTRADI project, EC contract QLK2-CT-2002-00843

Enterococchi *vanA* (105) di origine umana [31 (11 clinici e 30 intestinali)], animale (34) e alimentare (30) sono stati analizzati per la presenza e/o l'espressione dei determinanti genetici per sostanza di aggregazione (AS), gelatinasi (gel), citolisina (cyl) e proteina enterococcica di superficie (esp); per la citotossicità nei confronti della linea cellulare Hep-2 e la capacità di formare biofilm. L'amplificazione con le coppie di primer AGG-1/AGG-2 (seguita da restrizione degli amplificati con *EcoRI*) e ASA373-1/ASA373-2 ha rilevato la presenza dei geni *agg* (*prgB*, *asaI*, o *asa373*), in ceppi di *E. faecalis* di origine umana e alimentare. La maggior parte dei ceppi, indipendentemente dall'origine, è risultata positiva all'amplificazione per *gelE*; l'effettiva produzione di gelatinasi è risultata tuttavia dimostrata solo in isolati clinici e alimentari di *E. faecalis*. In nessun caso è stato possibile evidenziare modificazioni del citoscheletro e della morfologia nucleare delle cellule Hep-2, mentre la maggior parte degli isolati di *E. faecalis* di origine umana e alimentare, e di *E. durans* e *E. faecium* di origine animale, era in grado di produrre slime. Mediante esperimenti di coniugazione *in vitro* è stata inoltre valutata la co-trasferibilità del cluster *vanA* con i geni codificanti la AS, utilizzando come donatori tre ceppi *vanA* clumping-positivi, due di *E. faecalis* (F-25, alimentare, *ash10*; H-VI4, clinico, *ash10*, *asaI*, *asa373*,) e uno di *E. faecium* (A-N19, animale) I transconiuganti *vanA* sono stati analizzati per la presenza dei determinanti per la AS e per la capacità di aderire alle cellule Caco-2. Dopo stimolazione con feromoni, tutti i transconiuganti ottenuti a partire da *E. faecalis* F-25 e il 30% di quelli ottenuti a partire da *E. faecalis* H-VI4 (nessuno di quelli ottenuti a partire da *E. faecium* A-N19) mostravano un aumento significativo dell'adesione, dimostrando l'avvenuto co-trasferimento, e l'espressione, dei determinanti *agg*. I risultati ottenuti hanno evidenziato una differente distribuzione dei fattori di virulenza negli enterococchi *vanA* provenienti dai tre diversi serbatoi, con una prevalenza decisamente minore nei ceppi animali rispetto a quelli alimentari, suggerendo un maggiore coinvolgimento di questi ultimi nell'insorgenza delle infezioni umane sostenute da questi microrganismi.

## EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE E ASPETTI CLINICI DI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* MDR PRODUTTORI DI METALLO-ENZIMI DI TIPO VIM IN UNA STRUTTURA RIABILITATIVA

<sup>1</sup>Navarra A, <sup>2</sup>Migliavacca R, <sup>3</sup>Colinon C., <sup>2</sup>Nucleo E., <sup>4</sup>Spalla M., <sup>1</sup>Telecco S., <sup>3</sup>Docquier J.-D, <sup>3</sup>Rossolini G. M., <sup>2</sup>Pagani L.  
<sup>1</sup>Lab. di Microbiol. IRCCS "Fondazione S. Maugeri" Pavia, <sup>2</sup>Dip. S.M.E.C. Sez. Microbiologia, Università di Pavia, <sup>3</sup>Dip. di Biol. Molecolare, Università di Siena, <sup>4</sup>Lab. di Microbiol. IRCCS S. Matteo, Pavia, Italia.

**Introduzione:** Le metallo- $\beta$ -lattamasi (MBL) di tipo VIM ed IMP, conferiscono resistenza a tutti i  $\beta$ -lattamici, inclusi i carbapenemici e sono determinanti di resistenza emergenti di grande rilievo clinico ed epidemiologico nei batteri Gram-negativi patogeni nosocomiali. Ad oggi, l'epidemiologia delle MBL nelle Strutture di Riabilitazione (RF), che rappresentano un ampio "reservoir" di pazienti colonizzati e/o infetti da germi multi-resistenti agli antibiotici (MDR), rimane ampiamente sconosciuta.

**Metodi:** Nel periodo giugno 2002-marzo 2004 sono stati isolati presso una RF del Nord Italia, a cui afferiscono pazienti (pz) provenienti da differenti ospedali italiani, 303 stipiti di *P. aeruginosa* non replicati. 81 erano resistenti ai carbapenemici. La produzione di MBL è stata rilevata fenoticamente con E-test ed EPI-test. I determinanti MBL ed il loro contesto genetico sono stati studiati mediante PCR-RFLP, PCR-mapping, sequenziamento ed ibridizzazione del DNA. La PFGE è stata utilizzata per stabilire le relazioni clonali.

**Risultati:** 19 degli 81 isolati resistenti ai carbapenemici sono risultati produttori dell'enzima VIM-1 codificato da *bla*<sub>VIM-1</sub> localizzato su integroni diversi di Classe I: In85, In80, In70, In110 e In105. 10/19 ceppi, isolati da pz in neuroriabilitazione, erano epidemiologicamente correlati, suggerendo una diffusione clonale; i rimanenti, non strettamente correlati fra loro, coesistevano nella stessa RF. Gli isolati di *P. aeruginosa* VIM-1 positivi sono stati ottenuti da pz al ricovero, dimostrando la circolazione di tali ceppi nelle strutture ospedaliere di provenienza. L'analisi delle caratteristiche cliniche dei pz ha permesso di definire il ruolo patogeno dei ceppi produttori di MBL. **Conclusioni:** I risultati ottenuti dimostrano che le strutture riabilitative rappresentano un "reservoir" di *P. aeruginosa* MDR produttori di MBL di tipo VIM-1 e che la loro diffusione negli ospedali per acuti sta assumendo dimensioni preoccupanti. Dovrebbero essere applicate, quindi, al fine di individuare i produttori di MBL e contrastare la diffusione di *P. aeruginosa* MDR, misure preventive e di controllo, includendo rigorosi protocolli microbiologici.

## CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI ANTIBIOTICO RESISTENZE DI CEPPI EPIDEMICI DI *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR TYPHI E PARATYPHI A RESISTENTI AI CHINOLONI, RESPONSABILI DI FEBBRE ENTERICA IN INDIA.

Paglietti B.<sup>1</sup>, Gaiand R.<sup>2</sup>, Murgia M.<sup>1</sup>, Uzzau S.<sup>1</sup>, Rubino S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dip. di Scienze Biomediche, Sez. di Microbiologia Sperimentale e Clinica, Università di Sassari.

<sup>2</sup> Dept. of Microbiology, Safdarjung Hospital and assoc VMMC. New Dehli, India.

La febbre tifoide rappresenta un rilevante problema sanitario non solo per l'elevata morbosità ma anche per la scarsa disponibilità di agenti antimicrobici efficaci in seguito alla diffusione di ceppi multiresistenti, in particolare nei Paesi in via di Sviluppo. In questo lavoro è descritta l'analisi di loci genici associati alla resistenza a chinoloni in 5 isolati clinici di *Salmonella enterica* serovar Typhi (3 casi) e Paratyphi A (2 casi), resistenti a ciprofloxacina (CIP<sup>R</sup> MIC > 4  $\mu$ g/mL), e in altri isolati clinici di Typhi e Paratyphi A a ridotta sensibilità alla ciprofloxacina (MIC 0.125-1  $\mu$ g/mL). Tutti gli isolati analizzati provenivano dal Safdarjung Hospital di New Delhi. E' stato dimostrato che la resistenza ai fluorochinoloni (acido nalidixico e ciprofloxacina) è legata a mutazioni della QRDR (Quinolone Resistance Determining Region) dei geni codificanti la DNA girasi e la Topoisomerasi IV. Infatti, tutti gli isolati Typhi e Paratyphi A CIP<sup>R</sup> possedevano una doppia mutazione in *gyrA* ed una in *parC*, mentre gli isolati con ridotta sensibilità alla ciprofloxacina possedevano una singola mutazione nel gene *gyrA* ed una in *parC*. Gli isolati di Typhi, in aggiunta alla CIP<sup>R</sup>, presentavano resistenza antibiotica multipla, trasferivano per coniugazione la resistenza alla tetraciclina e possedevano inoltre un integrone di Classe 1 (nel plasmide coniugativo) che conferiva la resistenza al cotrimoxazolo. Infine, tutti sono stati isolati da pazienti con quadri clinici complicati di febbre enterica. Viceversa, gli isolati di Paratyphi A CIP<sup>R</sup> erano sensibili a cotrimoxazolo e tetraciclina ed associati a presentazioni cliniche meno severe. Sebbene di recente sia stato riscontrato un decremento nell'isolamento di ceppi multiresistenti (ampicillina, cloramfenicolo, cotrimoxazolo e tetraciclina) di Typhi e Paratyphi A, l'identificazione in India di isolati clinici di Typhi CIP<sup>R</sup> particolarmente virulenti e con antibiotico resistenza multipla codificata da plasmidi coniugativi e integroni, desta notevole preoccupazione. In particolare la presenza di integroni potrebbe significare l'acquisizione di ulteriori cassette di resistenza antimicrobica, quali *veb-1* che conferisce la resistenza alle cefalosporine, eliminando l'ultima valida alternativa terapeutica in questi casi di febbre tifoide.

## IMPIEGO DI SISTEMI OLFATTIVI ARTIFICIALI NELLA DIAGNOSTICA MICROBIOLOGICA: UNO STUDIO PRELIMINARE.

L. A. Casalnuovo\*, D. Di Piero°, M. Coletta°, A. De Lorenzo+, P. Di Francesco\*.

\*°Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Sez. di \*Microbiologia e di °Chimica Medica, +Dipartimento di Neuroscienze, Sez. di Alimentazione e Nutrizione Umana, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", Roma.

I sistemi olfattivi artificiali, comunemente detti nasi elettronici, sono strumenti composti da un sistema di campionamento e da una matrice di sensori chimici in grado di identificare gli odori.

Il naso elettronico zNose<sup>TM</sup> è un gas-cromatografo basato sulla tecnologia delle onde acustiche superficiali (GC-SAW sensor). Esso impiega: a) un gas-cromatografo ultra-rapido che separa l'odore nelle sue componenti molecolari; b) un sensore piezoelettrico (cristallo di quarzo) la cui frequenza di oscillazione diminuisce in funzione dell'aumento di massa dovuto alle molecole adsorbite sul sensore. I segnali vengono elaborati in un'immagine olfattiva polare e in un cromatogramma che forniscono in pochi secondi un'analisi qualitativa e quantitativa dell'odore.

Nei nostri esperimenti abbiamo utilizzato il naso zNose<sup>TM</sup> per rilevare i vapori generati dal metabolismo di batteri e funghi durante la crescita su terreno solido e in brodo. Le colture dei batteri (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*) (gentilmente forniti dal Prof. C. Favalli e dalla Dott.ssa C. Fontana, Cattedra di Microbiologia Clinica, Policlinico Tor Vergata, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata") e dei lieviti (*Saccharomyces cerevisiae* e tre specie di *Candida*) sono state incubate a 37°C per 24 e 48 ore. I vapori sono stati analizzati dal naso elettronico. Le immagini olfattive ottenute erano specifiche per ogni specie studiata. Inoltre, immagini olfattive di ceppi appartenenti alla stessa specie erano identiche. I nostri esperimenti, sebbene preliminari, dimostrano che il naso elettronico può riconoscere la produzione di sostanze microbiche volatili a livello di specie. I risultati ottenuti promettono interessanti innovazioni nella diagnostica microbiologica.

Il lavoro è stato in parte finanziato da Progetto FIRB n° RBNE01P4B5-006 e Progetto Finalizzato BS1 Regione Campania.

## NUOVE VARIANTI DELLA CASSETTA GENICA SCC<sub>mec</sub> IN ISOLATI CLINICI DI STAPHYLOCOCCUS AUREUS.

Petrelli Dezemona, D'Ercole Stefania, Prenna Manuela, Ripa Sandro, Vitali Luca Agostino.

Dipartimento di Biologia M.C.A., Università di Camerino, 62032, Camerino (MC).

Il gene *mecA* di *Staphylococcus aureus* fa parte di una regione cromosomica chiamata "staphylococcal cassette chromosome *mec*" (SCC<sub>mec</sub>) che non è presente negli *Staphylococcus aureus* meticillina-sensibili (MSSA). L'SCC<sub>mec</sub> forma un'isola genica inserita nel cromosoma di *S. aureus* in un sito conservato vicino all'origine di replicazione.

Nell'ambito di un ampio studio epidemiologico condotto sullo *S. aureus*, sono stati rilevati 12 ceppi meticillina-resistenti e positivi al gene *mecA* con associazione atipica dei geni *pls*, *ermA* e *tetK*, che suggeriva un profilo della SCC<sub>mec</sub> non riportato in letteratura. Al fine di approfondire tale osservazione sono stati effettuati esperimenti di multiplex-PCR e di tipizzazione del complesso *ccrAB*. I risultati ottenuti hanno permesso l'identificazione di 4 nuove varianti della SCC<sub>mec</sub>. In uno dei ceppi il profilo corrisponde a quello di tipo IA ma positivo al *mecI*. In due casi si è riscontrato un tipo I nel quale la regione 5' non contiene il gene *pls* completo mentre per i rimanenti due ceppi la caratterizzazione ha prodotto profili non associabili in alcun modo ai tipi noti. Infatti, uno dei ceppi è positivo alla sola regione a valle del gene *pls*, la quale è presente anche nel secondo insieme al locus pT181. Tutti i ceppi sono stati caratterizzati anche mediante PFGE. I profili di macrorestrizione SmaI ottenuti indicano che il gruppo di *S. aureus* oggetto di studio si presenta eterogeneo con ceppi che hanno un profilo di macrorestrizione unico, non correlabile con nessun altro all'interno del gruppo stesso. Tale situazione conferma quanto ottenuto con la tipizzazione della cassetta *mecA*. Viene, infine, proposto un ampliamento della classificazione SSC<sub>mec</sub> esistente che includa le denominazioni associate ai nuovi tipi rilevati.

## TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI CLINICI DI *CANDIDA* PRESENTANTI TOLLERANZA O RESISTENZA AGLI ANTIFUNGINI

Sisto F, Drago M, Stano P, Scaltrito MM, Corbellino\* M, Fucale° G e Morace G

Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Milano; \*Clinica Malattie Infettive, Ospedale Luigi Sacco, Milano; Laboratorio Analisi, Ospedale CTO, Torino

La tipizzazione molecolare di ceppi clinici sequenziali di *Candida albicans* presentanti uno spettro di tolleranza/resistenza agli antifungini utilizzabili per via sistemica, inclusi caspofungina e voriconazolo, è stata effettuata utilizzando la metodica MLST (*Multi-Locus Sequence Typing*). La stessa metodica è stata utilizzata per la tipizzazione molecolare di tre ceppi di *Candida glabrata*, isolati da campioni biologici diversi di uno stesso paziente, presentanti diverso spettro di sensibilità/tolleranza ai derivati azolici. La metodica utilizzata prevede l'amplificazione di porzioni di geni "housekeeping", il sequenziamento dei frammenti ottenuti e l'analisi delle sequenze nucleotidiche per ciascun gene. Per entrambe le specie, la metodica ha rivelato una sostanziale identità tra i ceppi studiati, le sequenze geniche risultavano simili o identiche con percentuali da 94 a 100% a seconda dei geni considerati. Tale stretta similitudine consente di affermare che i ceppi sono tra loro identici. Per i ceppi di *Candida glabrata* abbiamo proceduto ad un'ulteriore analisi verificando a quale gruppo (*clade*) appartenessero i nostri ceppi, confrontando i polimorfismi nucleotidici ottenuti con quelli presenti in internet ([www.mlst.net](http://www.mlst.net)) per i *loci* analizzati. Tale analisi ha rilevato che i ceppi studiati appartengono al tipo St(*Sequence type*)<sup>3</sup>. L'identità dei ceppi è stata confermata mediante l'utilizzazione di altre metodiche molecolari di tipizzazione quali RAPD. L'identità molecolare dei ceppi studiati permette di affermare che: a) i ceppi sequenziali di *Candida albicans* dimostrano la persistenza dello stesso biotipo quale responsabile dell'infezione e che la resistenza osservata *in vitro* alla caspofungina è correlabile al fallimento terapeutico riscontrato; b) l'infezione sostenuta da *Candida glabrata* era disseminata anche se i ceppi presentavano un diverso fenotipo (sensibile/tollerante) agli azoli. Attualmente, stiamo indagando sugli eventuali meccanismi molecolari della tolleranza/resistenza osservata fenotipicamente nei ceppi studiati analizzando sia la maggiore espressione di pompe di efflusso sia mutazioni a carico dei geni che codificano per gli enzimi bersaglio.

Lavoro eseguito nell'ambito del progetto PRIN 2003-2004 (no. 2003062784)

## DIMINUITA PRESENZA DI FATTORI DI VIRULENZA IN *ESCHERICHIA COLI* UROPATOGENI ANTIBIOTICO-RESISTENTI

S. Puglisi<sup>1</sup>, A. Speciale<sup>1</sup>, C. Cocuzza<sup>2</sup>, G. Blandino<sup>1</sup>, S. Bramati<sup>3</sup>, G. Saggio<sup>1</sup>, R. Musumeci<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche - Università di Catania.

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Clinica, Prevenzione e Biotecnologie Sanitarie - Università di Milano-Bicocca, Monza.

<sup>3</sup>Laboratorio di Microbiologia - Ospedale San Gerardo, Monza.

Le infezioni del tratto urinario (IVU) sono tra le più comuni patologie infettive nell'uomo con una prevalenza fortemente influenzata dal sesso e dall'età. Le IVU sono comuni nelle giovani donne e circa il 50% delle donne adulte riportano almeno un episodio di IVU nella vita.

Le IVU sono processi flogistici acuti, subacuti o cronici, sostenuti da microrganismi, che possono riguardare le basse (cistite, uretrite) o le alte vie urinarie (nefrite, pielonefrite, ascessi). Possono essere suddivise in complicate e non complicate, e queste ultime, rappresentate prevalentemente dalle cistiti, costituiscono epidemiologicamente l'80% delle infezioni urinarie e colpiscono molto più frequentemente le donne.

*Escherichia coli* è di gran lunga la causa più comune di infezioni del tratto urinario. In ceppi di *E. coli* che causano IVU sono stati descritti numerosi fattori di virulenza, i più importanti dei quali sembrano essere l'emolisina, il fattore citotossico necrotizzante 1 (CNF-1), l'aerobactina e adesine, quali le fimbrie di tipo 1 e le fimbrie P.

Nel presente lavoro è stata valutata, con il metodo della broddiluizione scalare, l'antibiotico-sensibilità *in vitro* di 378 ceppi di *E. coli* provenienti da urine di pazienti con una batteriuria significativa e isolati, consecutivamente, dall'Azienda Policlinico dell'Università di Catania (124) e dall'Ospedale San Gerardo di Monza (254) nell'arco di due mesi. Gli antibiotici che sono stati saggiati, fluorochinoloni, aminopenicilline, protette e non, cefalosporine, cotrimossazolo, nitrofurantoina, sono tra i più comunemente impiegati nella pratica clinica per le infezioni del tratto urinario.

Al fine di trovare una correlazione tra patogenicità e resistenza alle varie classi di antibiotici, è stata inoltre effettuata su tutti i ceppi, mediante PCR, la valutazione genotipica dei 5 fattori di virulenza suddetti, amplificando i geni che codificano per tali fattori.

I nostri risultati suggeriscono che negli *E. coli* uropatogeni la resistenza agli antibiotici, e in modo particolare quella ai fluorochinoloni, possa essere associata a una diminuita espressione di alcuni fattori di virulenza a loro volta correlati o meno ad elementi ectocromosomiali quali le "isole di patogenicità" (PAI), così come ipotizzato di recente da alcuni Autori.

## PATOGENI RESPONSABILI DI SETTICEMIE CATETERE-CORRELATE

A.Lambiase, M.Del Pezzo, A.Napolitano, C.Petagna e F.Rossano  
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L.Califano"  
Facoltà di Medicina e Chirurgia  
Università di Napoli "Federico II"

I cateteri venosi centrali (CVC) sono dispositivi vascolari introdotti attraverso una vena centrale (giugulare interna, succlavia, femorale, basilica) o periferica la cui punta viene fatta avanzare fino alla vena cava superiore, in prossimità dell'atrio destro. La setticemia, ossia l'associazione tra batteriemia ed un quadro clinico caratterizzato dalla presenza di SIRS, viene usualmente distinta in primitiva e secondaria in base alla presenza o meno di un focolaio infettivo primitivo clinicamente evidente.

Nel caso di pazienti portatori di CVC, si parla di "setticemia catetere-correlata" quando vi è positività colturale per il medesimo microrganismo, sia su sangue prelevato da vena periferica che dal CVC (rapporto ufc CVC/sangue > 10) ed inoltre si isola lo stesso microrganismo dalla punta del CVC al momento della rimozione ed in assenza di altra fonte di infezione.

I patogeni più frequentemente responsabili di setticemie catetere-correlate sono Stafilococchi coagulasi-negativi (CNS), *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, Gram-negativi del gruppo KES e, in progressivo incremento, Enterococchi e miceti tipo *Candida*. In questa nota gli AA intendono individuare quali siano i patogeni maggiormente responsabili di setticemie catetere-correlate nell'ambito delle terapie intensive e delle chirurgie del Policlinico Universitario "Federico II".

Monitorando il periodo gennaio 2004-gennaio 2005, da un totale di 407 CVC pervenuti alla nostra attenzione, è emerso che i patogeni maggiormente responsabili sono, per i Gram-positivi, CNS (12%), *Enterococcus spp* (4%) e *S.aureus* (2.4%), mentre per i Gram-negativi si riscontrano *P.aeruginosa* (5%), *A.baumannii* (2.4%) e *E.coli* (2%). Anche l'isolamento di *Candida* non è raro (4%) mentre in misura minore è possibile riscontrare l'isolamento di ceppi di *S.marcescens*, *E.cloacae*, *Klebsiella spp*, *A.xylooxidans*, *Proteus spp* e *M. morgani*.

L'utilizzo dei CVC è indispensabile nella pratica medica ed in particolar modo nelle terapie intensive. Tuttavia mentre garantiscono un accesso vascolare sicuro, nel contempo rappresentano un fattore di rischio per complicanze infettive. Per limitare tale problema è necessario osservare scrupolosamente indicazioni precise sia per l'inserimento del dispositivo (lavaggio antisettico delle mani, adeguata scelta del sito, applicazione di misure di asepsi, applicazioni di misure protettive per l'operatore) sia per la cura dello stesso (disinfezione con iodopovidone, sostituzione del dispositivo dopo 5-7 gg).

## METALLO-B-LATTAMASI IN ISOLATI CLINICI DI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*: RISULTATI DEL PRIMO MONITORAGGIO NAZIONALE.

L. Pagani<sup>1</sup>, F. Luzzaro<sup>2</sup>, C. Mugnaioli<sup>3</sup>, M. Spalla<sup>4</sup>, M. Perilli<sup>5</sup>, G. Babini<sup>6</sup>, G. Gesu<sup>7</sup>, G. Amicosante<sup>5</sup>, A. Toniolo<sup>2</sup>, G.M. Rossolini<sup>3</sup>.

Università di Pavia<sup>1</sup>, Università dell'Insubria<sup>2</sup>, Università di Siena<sup>3</sup>, I.R.C.C.S. Policlinico San Matteo Pavia<sup>4</sup>, Università dell'Aquila<sup>5</sup>, Becton-Dickinson Europe<sup>6</sup>, Ospedale Niguarda Milano<sup>7</sup>.

**Introduzione:** Le metallo-b-lattamasi (MBL) sono enzimi a spettro esteso in grado di idrolizzare i carbapenemi e la maggior parte degli altri b-lattamici rendendoli inefficaci. La recente emergenza delle MBL in *Pseudomonas aeruginosa* rappresenta quindi un evento di grande rilievo clinico. Scopo dello studio è stato di definire la prevalenza in Italia delle MBL in isolati clinici di *P. aeruginosa*.

**Metodi:** Lo studio ha coinvolto 14 laboratori di microbiologia clinica distribuiti sul territorio italiano. Nel periodo settembre-dicembre 2004 sono stati raccolti tutti gli isolati di *P. aeruginosa*, consecutivi, non replicati e resistenti all'imipenem (IMI-R, MIC > 8 mg/L). L'identificazione e l'antibiogramma sono stati ottenuti con pannelli ID/AST Phoenix System (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD). La produzione di MBL è stata valutata mediante metodi molecolari (Colony-blot, amplificazione genica).

**Risultati:** Sono stati studiati complessivamente 2103 isolati clinici di *P. aeruginosa*: di questi, 262 (12.5%) sono risultati IMI-R. L'analisi molecolare ha dimostrato che 27/262 isolati (10.3%) producevano una MBL acquisita: 22 di tipo VIM e 5 di tipo IMP. Gli isolati provenivano da 7 e da 3 ospedali rispettivamente. In un solo centro sono stati isolati sia VIM che IMP produttori. In totale, isolati di *P. aeruginosa* produttori di MBL sono stati identificati in 9 ospedali distribuiti su tutto il territorio nazionale. Fra gli isolati IMI-R, la prevalenza di stipiti produttori di MBL variava da 0 a 61% nei differenti centri.

**Conclusioni:** Gli isolati di *P. aeruginosa* produttori di MBL acquisite sono presenti su tutto il territorio nazionale, sebbene la loro prevalenza rimanga relativamente bassa. Un costante monitoraggio della situazione appare una misura essenziale per evitare il diffondersi di questi temibili determinanti di resistenza.

Si ringrazia la Becton Dickinson Europe per il supporto finanziario.

## INIBIZIONE SELETTIVA DELLA RNA POLIMERASI IN ISOLATI CLINICI DI *M. TUBERCULOSIS* RMP-RESISTENTI E MDR MEDIANTE NUOVI DERIVATI DELL'ACIDO FENAZIN-1-CARBOSSILICO

M. Saddi<sup>1</sup>, L.I. Palchykovska<sup>2</sup>, B. Saddi<sup>3</sup>, V.G. Kostina<sup>2</sup>, T.S. Shestakova<sup>2</sup>, L. Chisu<sup>1</sup>, I.V. Alexeeva<sup>2</sup>, A.D. Shved<sup>2</sup>, A. De Logu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Sezione di Microbiologia Medica, Università di Cagliari

<sup>2</sup>Department of Molecular Virology, Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

<sup>3</sup>Laboratorio di Microbiologia, Laboratorio di Analisi Ospedale SS. Trinità, Cagliari

La tubercolosi e l'aumentata incidenza delle infezioni sostenute da ceppi resistenti e multi-resistenti di *M. tuberculosis* rappresentano ancora un grave problema di salute pubblica a livello mondiale. Nel tentativo di individuare nuove molecole impiegabili per lo sviluppo di potenziali agenti antimicobatterici, abbiamo studiato una serie di derivati dell'acido fenazina-1-carbossilico in grado di inibire in vitro la RNA polimerasi. L'inibizione determinata per alcuni di tali derivati è comparabile a quella determinata per RMP. Al fine di valutare la correlazione tra l'inibizione della RNA polimerasi e l'attività antibatterica, abbiamo studiato l'attività nei confronti di *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294, INH-R ATCC 35822, RMP-R ATCC 35838, PZA-R ATCC 35828 e SM-R ATCC 35820. Diversi isolati clinici comprendenti ceppi sensibili, resistenti e MDR sono stati inclusi in questo lavoro. I risultati ottenuti indicano che alcuni derivati dell'acido fenazina-1-carbossilico mostrano valori di MIC nei confronti dei ceppi sensibili di *M. tuberculosis* comparabili a quelli determinati per INH e RMP e si dimostrano generalmente più attivi di SM e EMB. È interessante notare che l'attività determinata nei confronti dei ceppi sensibili è paragonabile a quella determinata nei confronti dei ceppi di *M. tuberculosis* resistenti e MDR di collezione o di isolamento clinico. Nonostante il bersaglio sia comune a quello della RMP, non è stata determinata alcuna differenza tra l'attività nei confronti degli isolati RMP-resistenti, il ceppo RMP-R ATCC 35838 ed i ceppi RMP-sensibili. Gli studi di attività in cellule J774 infettate con *M. tuberculosis* H37Rv indicano inoltre che i derivati studiati sono in grado di esplicare una significativa attività intracellulare. I derivati dell'acido fenazina-1-carbossilico possono pertanto rappresentare un modello per lo sviluppo di nuovi farmaci per la terapia delle infezioni sostenute da *M. tuberculosis* resistenti e MDR.

## STUDIO DELLA DINAMICA DI MUTAZIONI NELLA PROTEASI DI HIV-1 ASSOCIATE A RESISTENZA DURANTE L'INTERRUZIONE TERAPEUTICA

MM Santoro<sup>1</sup>, C Gori<sup>2</sup>, V Svicher<sup>1</sup>, M Santoro<sup>1</sup>, N Esposito<sup>1</sup>, M Zaccarelli<sup>2</sup>, S Giannella<sup>1</sup>, R D'Arrigo<sup>2</sup>, A Antinori<sup>2</sup>, CF Perno<sup>1,2</sup>, F Ceccherini-Silberstein<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Università di Roma "Tor Vergata"; <sup>2</sup>INMI L Spallanzani, Roma

**Introduzione:** La dinamica di scomparsa di varianti di HIV-1 resistenti durante l'interruzione del trattamento antiretrovirale (TI) dipende dal numero e dal tipo di mutazioni capaci di modificare la capacità replicativa del virus. In questo lavoro è stata esaminata l'evoluzione di mutazioni associate a resistenza agli inibitori della proteasi (PI) in TI.

**Metodi:** È stata condotta un'analisi su 88 pazienti aventi almeno due genotipi, uno all'ultimo regime terapeutico contenente PI (89 genotipi), ed uno (o più di uno) in TI (113 genotipi), con un D <1 anno tra il genotipo all'ultimo fallimento virologico alla HAART ed il genotipo all'inizio del TI. Complessivamente, il tempo mediano del TI è risultato di 4 mesi. Per verificare l'associazione tra le mutazioni e i valori di viremia e CD4 è stato utilizzato il median test; per verificare se specifiche mutazioni presenti prima del TI giochino un ruolo nella dinamica di scomparsa di altre mutazioni è stato utilizzato il test del chi-quadro, ed è stato stimato il tempo medio di scomparsa (t) delle mutazioni. A tal proposito è stato eseguito un fit della curva di decadimento esponenziale, in base al numero di mutazioni iniziali ( $N = N_0 \exp(-t/t)$ ) o alla presenza di specifiche mutazioni ( $F(t) = F_0 \exp(-t/t)$ ).

**Risultati:** La completa scomparsa delle mutazioni major M46I, I47V, I54V, G73S, V82A, I84V, L90M si è verificata in 6-12 mesi di TI. Al contrario, le mutazioni minor M36I, L63P, V77I sono rimaste stabili con una frequenza alta (>75%) anche dopo TI. La scomparsa delle mutazioni M46I e L90M è stata associata ad un maggior aumento di viremia e ad una forte diminuzione di CD4 comparati con la viremia ed i CD4 di pazienti mantenenti tali mutazioni. Il t della L90M è stato prolungato dalla specifica presenza al t=0 delle mutazioni M36I e K20R. Riguardo la scomparsa della M46I, l'assenza al t=0 della mutazione L10I ha determinato una più rapida scomparsa, mentre ancora dopo 240 giorni la M46I non tendeva a scomparire in presenza della M36I al t=0.

**Conclusioni:** Determinate mutazioni compensatorie giocano un ruolo fondamentale nel mantenimento e/o scomparsa delle mutazioni M46I e L90M al fallimento virologico durante TI. Complessivamente, la caratterizzazione di mutazioni nocive per la fitness virale è di estrema utilità nel disegno di strategie terapeutiche finalizzate a ridurre al minimo il danno associato al virus in pazienti pluritrattati.

## REAL-TIME PCR: UNA SVOLTA NELLA DIAGNOSI DI CHLAMYDIA PNEUMONIAE NELLE INFEZIONI VASCOLARI

R. Sessa, G. Schiavoni, M. Di Pietro, A. Petrucca<sup>1</sup>, P. Cipriani, C. Zagaglia, S. Faccilongo, G. Cervino, G. Balduino, M. del Piano

Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, Università degli Studi di Roma "La Sapienza", <sup>1</sup>Azienda Ospedaliera S. Andrea, Roma

La recente introduzione della real-time PCR ha contribuito notevolmente allo sviluppo della diagnostica microbiologica in quanto consente la rivelazione, la quantificazione e la genotipizzazione di diversi agenti patogeni e risulta di particolare interesse per quei microrganismi in grado di determinare infezioni croniche.

Tra gli agenti infettivi responsabili di infezioni croniche la *Chlamydia pneumoniae* è stata negli ultimi anni implicata nella patogenesi dell'aterosclerosi.

Lo scopo del nostro studio è stato quello di ricercare il DNA di *C. pneumoniae*, mediante real-time PCR, nelle lesioni aterosclerotiche carotidee, nei linfonodi e nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), campioni prelevati dallo stesso soggetto durante endoarterectomia carotidea.

Sono stati analizzati 30 campioni di lesione aterosclerotica carotidea, 30 campioni di linfonodi e 30 campioni di PBMC e in ciascun campione la ricerca di DNA di *C. pneumoniae* è stata effettuata utilizzando la real-time PCR, basata sul frammento *PstI* specie-specifico di *C. pneumoniae* e l'*ompA* nested touchdown PCR.

La *C. pneumoniae* è stata riscontrata, mediante real-time PCR, nelle lesioni aterosclerotiche carotidee, nei linfonodi e nei PBMC rispettivamente nel 53%, 57% e 70% dei campioni esaminati.

In particolare la quantità di DNA di *C. pneumoniae* riscontrata nelle lesioni aterosclerotiche è compresa tra 19 e 179 copie genomiche/reazione, nei linfonodi tra 22 e 3192 copie genomiche/reazione e nei PBMC tra 64 e 10788 copie genomiche/reazione.

Per quanto riguarda la ricerca della *C. pneumoniae* mediante *ompA* nested touchdown PCR, la *C. pneumoniae* è stata riscontrata nelle lesioni aterosclerotiche carotidee, nei linfonodi e nei PBMC rispettivamente nel 33%, 26% e 47%.

In conclusione i nostri risultati suggeriscono, da una parte, che la tecnica di real-time PCR è un valido sistema per individuare i pazienti a rischio per patologie cardiovascolari e, dall'altra, confermano ulteriormente che i PBMC rappresentano il campione di elezione per la ricerca di *C. pneumoniae* nelle infezioni vascolari.

## STUDIO DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA DOPO RICHIAMO VACCINALE ANTI-EPATITE B IN PAZIENTI AFFETTI DA DIABETE DI TIPO 1 "NON RESPONDERS"

Sommese L.<sup>1</sup>, Mattered S.<sup>1</sup>, Sanges M.R.<sup>1</sup>, Cafaro M.R.<sup>1</sup>, Mennella C.<sup>1</sup>, Sasso S.<sup>1</sup>, Pezone L.<sup>4</sup>, Romano C.<sup>3</sup>, Lucivero G.<sup>3</sup>, Passaro P.<sup>2</sup>, Prisco F.<sup>2</sup>, e Iafusco D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> DIP. Medicina Sperimentale – Sezione Microbiologia e Microbiologia Clinica, SUN

<sup>2</sup> DIP. Pediatria – Servizio di Diabetologia Pediatrica "G. STOPPOLONI", SUN

<sup>3</sup> DIP. Gerontologia Geriatria e Malattie del Metabolismo, SUN

<sup>4</sup> DIP. Patologia, Servizio di Immunopatologia, SUN

La sierconversione dopo vaccinazione anti-epatite B, in pazienti con diabete mellito tipo 1, è un tema tuttora controverso. Recentemente abbiamo osservato una minore risposta alla vaccinazione anti-epatite B, in bambini vaccinati nei tre anni precedenti l'esordio clinico del diabete rispetto alla popolazione sana.

Abbiamo voluto, quindi, esaminare la risposta umorale in 24 pazienti affetti da diabete tipo 1, risultati "non responders" al I° ciclo vaccinale, sottoponendoli ad un richiamo anti-epatite B. Il titolo di anticorpi specifici, i linfociti T, B, NK e l'espressione delle molecole di cooperazione linfocitaria T-B, sono stati valutati prima del richiamo vaccinale e dopo 1 mese, 3 e 6 mesi dallo stesso.

Solo il 25% della popolazione esaminata, risultata "non responders" al I° ciclo vaccinale, rimane sieronegativa, mentre nel restante 75%, già dopo un mese dal richiamo, si osserva sierconversione. I linfociti T, B e NK e la quota di linfociti T attivati non differiscono nei due gruppi di pazienti esaminati, ai differenti tempi d'osservazione. I "non responders" presentano, di base, una ridotta espressione (valutata come intensità media di fluorescenza - IMF) delle molecole CD23 e CD86 sui linfociti B e CD28 e CD152 sui linfociti T. Dopo un mese dal richiamo, l'espressione del CD86 sui linfociti B e del CD28 sui T, presenta un parallelo incremento nei due gruppi di pazienti, mentre si osserva un marcato incremento nell'espressione del CD152 nel gruppo "non responders" con una IMF superiore a quella osservata nel gruppo "responders".

In conclusione i risultati ottenuti indicano che, se il richiamo vaccinale anti-epatite B viene effettuato dopo l'esordio del diabete, la percentuale dei soggetti "non responders" si avvicina a quella osservata nella popolazione sana; il rapido incremento nell'espressione del CD152 sui linfociti T dei "non responders" potrebbe costituire il meccanismo molecolare della mancata sierconversione per una precoce attivazione dei meccanismi di regolazione negativi nello sviluppo delle reazioni immunitarie.

## VARIAZIONI NEL PROFILO DI ANTIBIOTICO-RESISTENZA IN *STAPHYLOCOCCUS* SPP. ISOLATI IN AMBIENTE OSPEDALIERO NEGLI ANNI 2002-2004

<sup>1</sup>TEGA Luciano, <sup>1</sup>BLANCO Giovanni, <sup>2</sup>OTTAVIANI Donatella, e <sup>1</sup>CARRATURO Antonio

<sup>1</sup> Servizio di Patologia Clinica, P. O. "S. M. Goretti", AUSL Latina

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Ancona

**Obiettivi** Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza rappresenta uno dei problemi sanitari di maggiore rilevanza mondiale. In particolare, all'interno del genere *Staphylococcus* è in costante aumento la diffusione della meticillino-resistenza soprattutto in ambito ospedaliero e la comparsa di ceppi multiresistenti. In questo studio abbiamo esaminato le variazioni nel profilo di antibiotico-resistenza dei ceppi appartenenti al genere *Staphylococcus* isolati presso il Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale "S. M. Goretti" di Latina nel triennio 2002-2004.

**Materiali e metodi** Gli stipiti batterici, isolati da materiali diversi (emoculture, tamponi, urine, espettorato, ecc.), sono stati identificati in base alle loro proprietà biochimiche attraverso il sistema automatico Vitek (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France).

**Risultati** Nel corso dei tre anni di osservazione sono stati isolati 1011 ceppi di *Staphylococcus* spp. Relativamente alle due specie maggiormente isolate: *S. aureus* e *S. epidermidis*, lo spettro di antibiotico-resistenza si è andato modificando nel corso degli anni. In particolare, per lo *S. aureus* la resistenza alla meticillina ha avuto un andamento costante passando dal 45 % del 2002 al 52 % del 2003 e nel 2004 si è attestata al 48%. Vi è stata una riduzione della resistenza verso l'eritromicina (55, 51, 46%), la gentamicina (40, 35, 25%) e la clindamicina (41, 29, 25%), mentre è aumentata la resistenza verso la ciprofloxacina (54, 60, 63%). La moxifloxacina ha presentato invece una sensibilità dell'89% nel 2004. Anche il co-trimossazolo ha mantenuto una elevata sensibilità (96, 91, 89%). Nessuna resistenza è stata riscontrata per vancomicina, teicoplanina, linezolid e quinupristin/dalfopristin. Per quanto riguarda *S. epidermidis*, vi è stato un drammatico incremento nella meticillino-resistenza che è passata dall'86% nel 2002 al 90% nel 2003 al 94% nel 2004. Ha avuto un trend crescente anche la resistenza verso l'eritromicina (43, 50, 59%), la gentamicina (43, 53, 55%) e la clindamicina (25, 44, 59%), mentre vi è stata una riduzione della resistenza verso il co-trimossazolo (71, 62, 52%). Costantemente elevata è risultata la resistenza verso la ciprofloxacina (75, 80, 81%), mentre la moxifloxacina ha mostrato una sensibilità dell'86% nel 2004. Piena sensibilità hanno mostrato il linezolid e la vancomicina, mentre nel 2004 il 7% dei ceppi è risultato resistente alla teicoplanina.

**Conclusioni** I dati riportati in questo studio mostrano come il fenomeno dell'antibiotico-resistenza in ambito ospedaliero sia complessivamente in aumento con il rischio della diffusione di ceppi multi antibiotico-resistenti dall'ospedale verso la comunità.

## DIFFUSIONE DI $\beta$ -LATTAMASI A SPETTRO ESTESO TRA CEPPI DI ENTEROBACTERIACEAE ISOLATI DA INFEZIONI DELLE VIE URINARIE

M. Caccamo<sup>1</sup>, G. Bonfiglio<sup>1</sup>, G. Tempera<sup>1</sup>, G. Celenza<sup>2</sup>, G. Amicosante<sup>2</sup>, M. Perilli<sup>2</sup>.

Dipartimento di Scienze Microbiologiche, Università di Catania<sup>1</sup>;

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università di L'Aquila<sup>2</sup>

**Scopo del lavoro.** Valutare la diffusione di ES $\beta$ L in Enterobacteriaceae provenienti da uno studio sulle infezioni delle vie urinarie (IVU). Nel secondo trimestre del 2004, 5 centri di Microbiologia dell'Italia meridionale, hanno raccolto e inviato 1012 uropatogeni da IVU al Dip. di Scienze Microbiologiche dell'Università di Catania.

Gli enterobatteri (64.1%) sono stati i microrganismi più isolati in tutte le patologie urinarie ed *E. coli* (40.5%) è stato l'uropatogeno più isolato.

**Materiali e metodi.** L'attività in vitro di aztreonam, ceftazidime, cefepime, cefotaxime, piperacillina, piperacillina/tazobactam, imipenem, ciprofloxacina e levofloxacina è stata determinata mediante la tecnica di diluizione in agar, secondo NCCLS. Tutti i ceppi con ridotta sensibilità alle oximinocefalosporine sono stati analizzati con la metodica del doppio disco per determinare l'eventuale produzione di ES $\beta$ L. I geni di resistenza per le ES $\beta$ L sono stati individuati con la tecnica d'ibridizzazione su colonia utilizzando membrane di nylon e sonde geniche di tipo *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>PER</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>CTX</sub>. La natura dei geni per ES $\beta$ L è stata determinata per sequenziamento diretto dei prodotti di PCR con un sequenziatore automatico del tipo ABI PRISM 310.

**Risultati.** 56 microrganismi (5,5%) erano resistenti ad almeno una cefalosporina di terza generazione ed/o all'aztreonam. Dati di ibridizzazione, effettuata direttamente sui ceppi resistenti, dimostravano che: 37 ceppi (66%) possedevano un enzima tipo TEM; 29 (51,7%) tipo SHV; 12 (21,4%) tipo CTX e 18 (32%) tipo PER. Sono state ritrovate solo 2 ESBLs tipo TEM, TEM-52, in isolati di *P. mirabilis*. L'enzima SHV-12 era presente in 12 *E. coli* ed in tutti gli isolati di *K. pneumoniae* ed *E. cloacae*. CTX-M1, CTX-M3 e CTX-M15 sono state riscontrate in 11 *E. coli* and 1 *K. pneumoniae*. PER-1 è stata individuata in 10 *P. mirabilis*. L'associazione TEM e SHV è stata osservata nel 25% degli isolati, mentre TEM e SHV in combinazione con CTX sono state riscontrate solo in 5 *E. coli*.

**Conclusioni.** Questo studio conferma la diffusione delle ES $\beta$ L tra enterobatteri isolati da IVU. Risulta evidente che: i) le ESBLs più diffuse sono quelle della famiglia delle CTX-M; ii) le SHV sono molto comuni in *K. pneumoniae*; iii) la presenza di ES $\beta$ L di tipo PER in *P. mirabilis* indica la progressiva diffusione di tali enzimi tra le Enterobacteriaceae.

## CANDIDOSI SISTEMICHE IN UTIN: VALUTAZIONE DI ALCUNI PARAMETRI DI LABORATORIO

Trovato L., Greco A.M., Betta P., Romeo M.G., Oliveri S., Nicoletti G.

Azienda Ospedaliero Universitaria Policlinico di Catania

Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche Università di Catania

La candidosi sistemica, nel neonato, si presenta spesso con manifestazioni cliniche del tutto aspecifiche. Per tale motivo il neonatologo è costretto ad affidarsi ad una combinazione di parametri clinici, radiologici e di laboratorio, che seppur meno specifici, contribuiscono ad orientarlo verso una diagnosi presuntiva. Il tentativo di standardizzare le definizioni delle infezioni fungine sistemiche anche in ambito neonatologico ha contribuito, da un lato a fare chiarezza sui criteri sui quali fondare una diagnosi certa, probabile o possibile, dall'altro a prendere atto delle difficoltà operative che rendono difficile differenziare le tre situazioni a causa della gravità della patologia e di un eventuale ritardo nell'istaurare la terapia appropriata.

In questo studio presentiamo una analisi dei dati rilevati nel corso dell'anno 2004 su un gruppo di pazienti ricoverati nella UTIN dell'AOU Policlinico di Catania e relativi all'impiego di tecniche diagnostiche convenzionali associate alla ricerca dell'antigene mannano effettuata in ELISA mediante Platelia® *Candida* Ag.

L'indagine è stata effettuata su 70 nati pretermine, 37 M e 33 F, con età gestazionale compresa tra 25 e 38 settimane e con peso alla nascita tra 650 e 3900 grammi. La respirazione assistita ha interessato 30 neonati mentre la nutrizione parenterale 58. Su tutti i pazienti nel corso del ricovero sono state effettuate indagini microbiologiche (feci e tampone orofaringeo) per lo studio della colonizzazione, e in relazioni alle condizioni cliniche la ricerca dell'antigene mannano, l'emocoltura e la determinazione della proteina C reattiva (metodo quantitativo).

Sono stati evidenziati 7 casi di candidosi sistemica con emocoltura e/o CVC positivo per *Candida*. In 2 di questi casi la ricerca dell'antigene ha dato esito negativo, ma in uno di questi è stata isolata *Candida parapsilosis* verso la quale il kit Platelia® *Candida* Ag presenta una scarsa sensibilità; in 5 casi, classificabili come candidosi sistemiche probabili, le emocolture sono risultate negative mentre la ricerca dell'antigene positiva. L'analisi della colonizzazione nei neonati ha evidenziato una frequenza di positività maggiore sui campioni di feci (34/70) rispetto ai corrispondenti tamponi orofaringei (9/70). Una associazione statisticamente significativa è stata rilevata tra la elevata carica micotica fecale e la positività del tampone orofaringeo.

## MESSA A PUNTO DI UNA PCR PER L'ANALISI DI LEPTOSPIRA SPP. IN TESSUTI PARAFFINATI: ANALISI PRELIMINARI IN INDIVIDUI DECEDUTI PER SOSPETTA LEPTOSPIROSI ACUTA A CUBA.

Maria Vitale, Fabrizio Vitale, Yarelys Zamora Martinez<sup>1</sup>, Vincenzo Monteverde, Aleco D'Andrea e Santo Caracappa.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", Palermo.

<sup>1</sup> Istituto di Medicina Tropicale "Pedro Kouri" La Havana, Cuba

Riassunto:

La Leptospirosi è una malattia a carattere zoonosico diffusa in tutto il mondo, causata principalmente dai ceppi patogeni di *Leptospira* spp. L'infezione presenta un ampio spettro di manifestazioni cliniche spaziando da una sintomatologia lieve, simile ad una banale influenza a forme molto gravi caratterizzate da insufficienza di diversi organi (sindrome di Weil). Nelle regioni a clima tropicale come alcuni paesi dell'America latina, in alcune isole caraibiche, nelle isole Andamane in India, la leptospirosi rappresenta un grave problema di sanità pubblica specialmente nei periodi che seguono alla stagione delle piogge. Nei casi di epidemia le fasi acute della malattia possono risolversi anche nella morte di alcuni pazienti entro i primi 10 giorni dall'infezione per grave insufficienza respiratoria, epatica o renale prima che possa essere emessa una diagnosi. Considerando che questa grave sintomatologia può essere determinata da alcune infezioni virali anch'esse epidemiche in queste regioni, come ad esempio il Dengue, l'accertamento delle cause di morte in questi individui si basa essenzialmente in analisi istologiche e immuno-istologiche post-mortem che non sempre portano a una diagnosi certa. Noi abbiamo messo a punto un metodo di PCR su DNA estratto da sezioni di tessuto in paraffina che rileva specificamente le leptospire patogene. La PCR sul DNA estratto da sezioni di reni di animali sicuramente positivi ha mostrato positività. La PCR sul DNA di altri batteri e delle leptospire saprofiti ha dato risultati negativi. L'analisi preliminare su 5 campioni di tessuto paraffinato provenienti da casi dubbi di morte per leptospirosi acuta in Cuba hanno mostrato positività in 4/5 individui. Tale metodica può quindi essere utilizzata nei casi di morte improvvisa con il sospetto di leptospirosi acuta, ma, anche per studi retrospettivi sugli archivi anatomico-patologici.

## IMPATTO CLINICO DELL'ISOLAMENTO VIRALE DA LAVAGGIO BRONCOALVEOLARE

<sup>1</sup>Cristina Costa, <sup>1</sup> Federica Piana, <sup>1</sup> Massimiliano Bergallo, <sup>1</sup> Franca Sinesi, <sup>2</sup> Daniela Libertucci, <sup>2</sup> Marco Solidoro, <sup>1</sup> Samuela Margio, <sup>1</sup> Rossana Cavallo.

<sup>1</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica e Microbiologia, S.C.D.U. Virologia, Università di Torino

<sup>2</sup> S.C. Pneumologia, Ospedale San Giovanni Battista Molinette Torino.

**Introduzione.** Le infezioni polmonari sono un'importante causa di morbilità e mortalità nei pazienti ospedalizzati, soprattutto in condizioni di immunocompromissione. L'eziologia è batterica in oltre il 50% dei casi e per lungo tempo l'infezione virale è stata considerata solo nella diagnosi differenziale. Recentemente, con l'utilizzo di terapie immunosoppressive nei pazienti trapiantati ed il miglioramento della gestione del paziente grazie alla disponibilità di nuove terapie antivirali, la diagnostica virologica ha acquisito crescente importanza.

**Scopo.** L'obiettivo di questo studio è di valutare l'impatto clinico della diagnosi virologica mediante isolamento virale.

**Metodi.** Sono stati esaminati retrospettivamente 79 campioni di lavaggio broncoalveolare (BAL) prelevati da 57 pazienti (39 M, 18 F; età media 51.6 anni, range 17-85): 28 da 12 trapiantati di polmone (gruppo I), 26 da 23 pazienti con patologie ematologiche (gruppo II) e 25 da 22 pazienti ricoverati in reparto di terapia intensiva (gruppo III). I BAL sono stati posti in coltura su linee cellulari (PEU e VERO) per l'isolamento dei seguenti virus: CMV, HSV, VZV, RSV, Adenovirus, Virus Influenzale A e B e Virus Parainfluenzali. I risultati sono stati confrontati con i dati clinici, laboratoristici e radiologici.

**Risultati.** Nel gruppo I, 16 BAL (57%) di 8 pazienti erano positivi: 15 (93,8%) per CMV e 1 (6,2%) per Virus Parainfluenzale. Nel gruppo II, 7 BAL (27%) di 6 pazienti erano positivi: 6 (85,7%) per CMV (1 in coinfezione con Adenovirus e 1 con RSV) e 1 (14,3%) per Virus Parainfluenzale. Nel gruppo III, 6 BAL (24%) di 5 pazienti sono risultati positivi per CMV, di cui 1 in coinfezione con Virus Parainfluenzale.

**Conclusioni.** Nei pazienti di questo studio l'eziologia virale è risultata frequente (36,7%); in particolare, il CMV è stato isolato nel 93,1% dei BAL positivi. Il risultato dell'isolamento virale ha condotto alla modifica della terapia con la somministrazione di antivirali in 18 pazienti.

## DESCRIZIONE DI UN GRAVE CASO DI MUCORMICOSI CRANIO-FACCIALE

R. Greco<sup>1</sup>, V. Letizia<sup>1</sup>, G. Canzano<sup>2</sup> e I. Caserta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Settore di Microbiologia

<sup>2</sup>Settore di Biologia Molecolare

U.A.C. di Patologia Clinica – Azienda Ospedaliera “San Sebastiano” Caserta

Il termine **mucormicosi** comprende un gruppo distinto di infezioni causate da funghi appartenenti all'ordine dei *Mucorales*, solitamente *Rhizopus*, *Mortierella* e *Mucor*. Questi funghi sono largamente diffusi in natura, nutrendosi di vegetali in degradazione e diversi materiali organici. Sebbene i funghi e le spore mostrino una patogenicità intrinseca minima nei confronti dei soggetti sani, essi possono provocare infezioni aggressive e fulminanti in alcune condizioni cliniche, come malnutrizione, immunosoppressione, diabete mellito, acidosi gastrica, ecc.

Le mucormicosi sono, quindi, infezioni opportunistiche che raramente interessano l'uomo; l'infezione viene acquisita per inalazione, ingestione di spore o per via traumatica e può interessare l'area cranio-facciale, i seni paranasali, i polmoni, la cute, il tratto gastroenterico.

La mortalità elevata va dal 25 all'80%, a seconda della parte del corpo interessata e della reattività immunologica del paziente, e senza l'asportazione chirurgica dei tessuti infetti le speranze di salvezza diminuiscono notevolmente.

### CASO CLINICO

Maschio di anni 45, carpentiere.

Ricoverato per dolore e tumefazione della guancia destra, estesa alle palpebre, al naso, alla regione masseterina e parotidea.

Dopo qualche giorno si verificava una necrosi massiva nelle sedi sopra citate con estesa perdita di sostanza. Il paziente veniva sottoposto a toilette chirurgica con la necessaria enucleazione dell'occhio destro.

Trattata con ambisone 400 mg/die, l'infezione non si estendeva ulteriormente.

Soltanto in seguito a tale evento si evidenziava che il paziente era affetto da Diabete mellito tipo 2.

Attualmente il paziente è in attesa di intervento ricostruttivo di chirurgia plastica.

### MATERIALI E METODI

L'esame microscopico del materiale asportato di aspetto puruloide, non evidenziava forme micotiche. L'esame culturale, eseguito su terreno Sauboraud-Dextrose Agar (SAB, Oxoid) a 30°C rilevava, invece, la crescita di colonie bianco-grigiastre a tessitura fioccosa identificate microscopicamente, mediante blu di lattofenolo, come Zigomiceti del genere *Mucor*.

## ANTICORPI ANTI-BARTONELLA HENSELAE NELLA DIAGNOSI DI LABORATORIO

V. Grisolia, E. Roscetto, S. Piccoli, G. Avagliano, F. Tamburro, M. Del Pezzo\* P. Indolfi, \*\* F. Rossano

Azienda Universitaria Policlinico-Area Funzionale Diagnostica Microbiologica Università degli Studi di Napoli Federico II

\* Azienda Ospedaliera Santobono Pausilipon\*\* Oncologia Pediatrica-SUN

*Bartonella henselae* è eziologicamente correlata (95%) alla malattia da graffio di gatto (Cat Scratch Disease CSD). La CSD esordisce più frequentemente con febbre e astenia, 1-2 settimane dopo l'evento traumatico cutaneo, ed è caratterizzata da manifestazioni locali (cutanee e linfonodali talvolta a carattere suppurativo), ad evoluzione solitamente benigna se prontamente diagnosticate e adeguatamente trattate. Non sono infrequenti forme sistemiche complicate a carattere granulomatoso a localizzazione splenica o epatica, nonché a carico dei linfonodi mediastinici.

*B. henselae* è un bacillo gram negativo a lenta crescita. Le tecniche di biologia molecolare spesso non danno esito positivo (per la tardiva disponibilità dei campioni clinici?), mentre saggi sierologici di immunofluorescenza indiretta (IFI) possono fornire informazioni fin dalle prime settimane di malattia. Una rapida e corretta diagnosi microbiologica consente di differenziare la linfadenopatia correlata alla CSD da altre forme simili e di individuare le lesioni da *B. henselae* nell'ambito di altre malattie granulomatosi quali tubercolosi e sarcoidosi.

Sono stati da noi esaminati con l'IFI 30 sieri provenienti da soggetti in età pediatrica per il dosaggio di IgM e IgG anti-*B. henselae*. Fra questi il siero di 6 bambini, tutti con anamnesi correlabile ad infezione da *B. henselae* (convivenza con gatti, evento traumatico cutaneo) e con lesione cutanea granulomatosa, linfadenopatia distrettuale o diffusa, ha dimostrato positività delle IgM e in tempi diversi sierconversione delle IgG; uno solo mostrava assenza di IgM e presenza di IgG, e 23 erano negativi per entrambe le Ig. In questi ultimi l'assenza di anticorpi non è da attribuire al metodo (92% specificità) ma alla presenza di patologie non correlate all'infezione da *B. henselae* (neoplasia, tubercolosi e patologie benigne). In conclusione riteniamo che il sospetto diagnostico di infezione da *B. henselae* debba essere posto in tutti i casi di impegno linfonodale, associato o meno ad anamnesi positiva per evento traumatico, soprattutto in presenza di lesione cutanea granulomatosa.

Pertanto, è lecito prospettare che il dosaggio degli anticorpi specifici anti-*B. henselae* delle classi IgM e IgG, possa avere un ruolo nella diagnosi differenziale in quelle patologie per cui non risulti dirimente l'esame istopatologico.

## CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* E *KLEBSIELLA* spp ISOLATI DA CAMPIONI BIOPTICI DI PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE.

S. Schippa<sup>1</sup>, M. P. Conte<sup>1</sup>, L. Seganti<sup>1</sup>, K. Corsino<sup>1</sup>, I. Zamboni<sup>1</sup>, F. Chiarini<sup>1</sup>, O. Borrelli<sup>2</sup>, S. Cucchiara<sup>2</sup>, F. Rossano<sup>3</sup>.

Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, Università «La Sapienza», Roma; <sup>2</sup> Istituto di Clinica Pediatrica, Policlinico Umberto I, Università «La Sapienza», Roma, <sup>3</sup> Università di Napoli.

Molte sono le evidenze cliniche e sperimentali a sostegno dell'ipotesi che le malattie infiammatorie croniche dell'intestino (IBD) siano causate dalla perdita di tolleranza dell'ospite verso la microflora endogena. Un nostro recente studio sulla composizione della flora batterica associata alla mucosa di biopsie provenienti da pazienti pediatrici affetti da infiammazioni croniche intestinali ha evidenziato un'alterazione della microflora batterica ed un incremento dei batteri associati alla mucosa, come già osservato in pazienti adulti. Nell'ambito delle specie gram negative, tale aumento è significativo per i batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, in particolar modo per *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. L'attuale studio è stato indirizzato alla caratterizzazione biologica e molecolare di 82 ceppi di *E. coli* e 14 di *Klebsiella* spp. isolati dall'ileo, colon e retto di pazienti con IBD e di controlli sani. A tale scopo in questi ceppi sono stati studiati: a) la capacità invasiva ed adesiva; b) la presenza di convenzionali determinanti genetici legati alla virulenza dei maggiori gruppi patogenetici di *E. coli*; c) i profili plasmidici e cromosomali.

I risultati preliminari ottenuti hanno evidenziato: la significativa presenza di ceppi adesivi ed invasivi tra quelli provenienti da pazienti con IBD, di cui solo una piccola percentuale possiede alcuni dei caratteristici determinanti genetici associati alla virulenza; la presenza nei ceppi adesivi di profili plasmidici simili. Tali evidenze sono a sostegno dell'ipotesi che nell'ambiente intestinale di pazienti affetti da malattia infiammatoria cronica possono essere selezionati ceppi batterici con proprietà patogenetiche nuove, che dovranno essere caratterizzati mediante ulteriori studi.

## EMOCOLTURA DA ACCESSI VENOSI PROFONDI VS VENA PERIFERICA DETERMINAZIONE QUALI-QUANTITATIVA DELL'ETIOLOGIE DELLE SEPSI

Esperienza del Laboratorio di Microbiologia dell'Istituto dei Tumori di Napoli  
Dr. Gerardo Beneduce, Dr. Giacomo Iazzetta, Dr. Ivan Maressi.

Dal luglio 2004, in parallelo al sistema per emocoltura Signal Oxoid, si è utilizzato il metodo per la determinazione qualitativa dei germi coinvolti nella sepsi generalizzata con la contestuale conta della carica microbica circolante al momento del prelievo. Il nuovo metodo, Isolator 10 Oxoid, consente: la lisi immediata dei leucociti con la liberazione dei germi fagocitati; l'arricchimento mediante tecniche di centrifugazione; la possibilità di seminare su tutti i terreni solidi voluti allo scopo di evidenziare nell'arco delle 24-48 ore la crescita dei potenziali patogeni anche nel caso di coinfezioni (aerobi, anaerobi, germi non saccarolitici, germi comuni o esigenti, miceti).

L'immediatezza della semina su terreni solidi dal momento del prelievo e l'osservazione della distribuzione della crescita delle colonie, in caso di positività, evita il dubbio diagnostico dei falsi positivi.

La carica microbica, calcolata in funzione dei fattori di concentrazione e delle quantità di sangue emolizzato concentrato seminato, è di facile lettura nei casi di positività da vena periferica (da 2 a 100 UFC/ml). Nei casi di colonizzazione dei cateteri venosi profondi le cariche risultano frequentemente superiori a 10<sup>3</sup> UFC/ml raggiungendo anche valori superiori a 10<sup>5</sup>. La parità dei valori quantitativi da vena periferica e da catetere dimostra il non coinvolgimento dell'accesso venoso profondo nel processo settico.

Il sistema, attualmente da noi utilizzato, consente, oltre ad una più efficace capacità diagnostica (sensibilità, specificità, accuratezza) per gli obiettivi qualitativi e quantitativi, la possibilità di dimostrare la colonizzazione dei cateterismi vascolari profondi permanenti quale fonte di sepsi sistemica, anche in assenza di positività per le emocolture da vena periferica.

La sistematica procedura di semina su terreni per germi comuni ed esigenti in aerobiosi ed anaerobiosi ha consentito la dimostrazione, confrontando i dati dell'ultimo anno con quelli di uno studio retrospettivo, di una migliore performance diagnostica: incremento, statisticamente significativo, delle positività dimostrate e ampliamento della gamma di microrganismi coinvolti.

L'ottimizzazione del nuovo metodo ha inoltre ottenuto, nella nostra realtà nosocomiale, una maggiore attenzione e partecipazione dei clinici allo studio del paziente settico.

## CARATTERIZZAZIONE DI ISOLATI DI *STAPHYLOCOCCUS SPP.* DA PORTATORI DI LENTI A CONTATTO AFFETTI DA CONGIUNTIVITE

P. Catalanotti<sup>1</sup>, A. Del Prete<sup>2</sup>, M. Lucido<sup>1</sup>, M. R. Catania<sup>3</sup>, C. Visone<sup>1</sup>, F. Gallè<sup>3</sup>, L. Ortega De Luna<sup>3</sup>, M. Roselli<sup>1</sup>, F. Rossano<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Microbiologia e Microbiologia clinica, Seconda Università di Napoli; <sup>2</sup>Istituto di Scienze Oftalmologiche, Università di Napoli "Federico II"; <sup>3</sup>Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano", Università di Napoli "Federico II"

Negli ultimi anni è stato registrato un aumento di patologie oculari legate all'uso di lenti a contatto morbide. I più comuni contaminanti di lenti a contatto sono *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus*. Tali microrganismi sono in grado di produrre slime extracellulare, attraverso cui possono colonizzare l'epitelio della mucosa e/o materiali artificiali e causare gravi infezioni correlate all'uso di dispositivi medicali. La sintesi del polisaccaride è regolata da uno specifico locus di "adesione intercellulare" (*ica*), e in particolare dai geni *icaA* e *icaD*.

Altro importante determinante dell'aderenza precoce dei batteri è rappresentato dall'idrofobicità di superficie, che può facilitare *in vivo* la colonizzazione delle mucose e l'adesione a dispositivi medicali.

Nel presente lavoro sono stati analizzati 194 tamponi congiuntivali provenienti da 97 pazienti, portatori di lenti a contatto, affetti da congiuntivite non allergica presumibilmente di origine batterica, afferenti al Dipartimento Assistenziale di Diagnostica Microbiologica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria - Seconda Università di Napoli nel periodo settembre 2003-settembre 2004. I ceppi di *Staphylococcus spp.* isolati sono stati analizzati per determinare a) l'idrofobicità di superficie; b) la capacità di produrre slime e la presenza dei geni *ica*; c) l'antibioticoresistenza; d) il profilo PFGE.

Dai campioni risultati positivi sono stati isolati 139 ceppi batterici, tra cui 85 (61,1%) *S. epidermidis* e 18 (12,9%) *S. aureus*. La produzione di slime e la presenza dei geni *icaA* e *icaD* sono state osservate nel 74,1% degli isolati di *S. epidermidis* e nel 61,1% degli *S. aureus*.

I ceppi produttori di slime appartenenti ad entrambe le specie presentavano una maggiore idrofobicità di superficie e una maggiore resistenza a tutti gli antibiotici testati rispetto a quelli non produttori. Relativamente ai profili PFGE, soltanto gli isolati di *S. epidermidis* con alta idrofobicità mostravano pattern sovrapponibili.

I dati ottenuti confermano il ruolo di *Staphylococcus spp.* nella etiologia delle congiuntiviti in portatori di lenti a contatto e l'importanza della produzione di slime, e quindi della presenza dei geni ad essa correlati, nel meccanismo patogenetico delle infezioni associate a dispositivi medicali.

## ATTIVITA' ANTIMICROBICA DELL'OZONO

M. Lucido<sup>1</sup>, C. Luongo<sup>2</sup>, M.R. Catania<sup>3</sup>, A. Fogore<sup>1</sup>, M. R. Bassi<sup>1</sup>, M. Sorrentino<sup>1</sup>, L. Ortega de Luna<sup>3</sup>, M. Luongo<sup>2</sup>, P. Catalanotti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina sperimentale, Sezione di Microbiologia e Microbiologia clinica. S.U.N. <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze anestesologiche, chirurgiche e dell'emergenza. S.U.N. <sup>3</sup>Dipartimento di Biologia e Patologia cellulare e molecolare "L. Califano". Università di Napoli "Federico II".

Le proprietà terapeutiche dell'ozono sono state già ampiamente sfruttate in campo medico per il trattamento di pazienti con difficoltà circolatorie.

Grazie alle sue proprietà antinfiammatorie e antimicrobiche si è pensato di estendere l'utilizzo di questo gas anche alle patologie infettive. Sono riferiti i dati sperimentali **a)** sull'effetto inibitorio dell'O<sub>3</sub> sulla crescita batterica; **b)** sulla possibile interferenza dell'ozono sulla formazione dello *slime*; **c)** sugli effetti dell'O<sub>3</sub> sull'antibiotico resistenza; **d)** sulle variazioni del profilo di restrizione ad opera dell'ozono.

L'indagine è stata eseguita su ceppi isolati nei laboratori del DAS di Diagnostica Microbiologica dell'Azienda Universitaria Policlinico della Seconda Università di Napoli. I ceppi sono stati coltivati con le tecniche tradizionali ed è stata valutata la diversa sensibilità agli antibiotici. Tutte le prove sono state eseguite prima e dopo insufflazione della miscela ossigeno-ozono a tempi e concentrazioni diverse (5, 19, 49, 75 e 102 µg/mL). La crescita batterica è stata verificata con la conta batterica per piastramento. L'ozono ha un effetto inibitore dose e tempo dipendente sulla crescita sia dei batteri Gram-positivi (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mitis*) sia Gram-negativi (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*). Per quanto riguarda la produzione di *slime* è stato osservato che ceppi produttori di *slime* perdevano tale fattore di virulenza dopo insufflazione con concentrazioni sub inibenti di O<sub>3</sub>.

Si sono osservate modificazioni della MIC di carbenicillina, cefepime, cefoperazone, netilmicina e piperacillina/tazobactam nei confronti di *P. aeruginosa* multiresistente. Tale fenomeno è stato osservato solo in parte per altri batteri quali *K. pneumoniae*, in cui si è avuta una riconversione della MIC per ampicillina e cefazolina, e *S. mitis* in cui tale fenomeno è stato riscontrato solo per il cloramfenicolo. I profili PFGE dei ceppi nativi e trattati con ozono non evidenziano alcuna variazione tranne che per un ceppo di *S. agalactiae*, in cui si nota che il ceppo trattato alle concentrazioni di 49 e 75 µg/mL presenta delle bande al di sotto dei 200 Kb rispetto al controllo.

## ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI CANDIDA METAPSILOSIS E CANDIDA ORTHOSILOSIS IN UNA COLLEZIONE DI 150 CEPPI ISOLATI NELL'AREA PISANA

<sup>1</sup>A. Bertozzi, <sup>1</sup>A. Tavanti, <sup>2</sup>D. Campa <sup>1</sup>L. Hensgens, <sup>3</sup>M. Campa, and <sup>1</sup>S. Senesi

<sup>1</sup>Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze dell'Uomo e dell'Ambiente e <sup>3</sup>Unità Operativa di Microbiologia Universitaria, Presidio Ospedaliero di Cisanello, Università di Pisa

La recente dimostrazione che le differenze genotipiche tra i gruppi I, II, e III di *Candida parapsilosis* sono consistenti con il rango di specie per il gruppo II, denominato *C. orthopsilosis* e il gruppo III, denominato *C. metapsilosis* [1], giustifica l'interesse a studiare la frequenza di isolamento delle due specie di nuova definizione e le loro proprietà genotipiche/fenotipiche. Scopo di questo studio è stato quello di valutare l'incidenza di *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* in una collezione di 150 isolati clinici ed ambientali precedentemente identificati come *C. parapsilosis*. L'identificazione delle tre specie è stata condotta mediante un test basato sul diverso profilo di restrizione del gene *SADH* (alcol deidrogenasi secondaria) con l'enzima BanI. I ceppi tipizzati sono stati, quindi, caratterizzati mediante analisi del cariotipo e valutazione spettrofotometrica della produzione di biofilm. *C. parapsilosis* è risultata la specie più frequentemente isolata (83.3%) da campioni clinici ed ambientali, confermando l'ipotesi che questa specie sia riuscita a meglio adattarsi a colonizzare/infettare l'uomo. *C. orthopsilosis* è stata identificata nel 7.3% dei ceppi analizzati, mentre *C. metapsilosis*, per la quale fino ad oggi non erano stati descritti isolati clinici, ma solo ceppi di riferimento, è risultata presente nel 4.6% dei campioni clinici. L'analisi del cariotipo ha consentito di individuare assetti genotipici completamente distinti per le tre specie, ma ha anche evidenziato che esiste un certo grado di variabilità genetica nell'ambito di ciascuna specie. I dati ottenuti dallo studio della produzione di matrice extracellulare hanno indicato che i ceppi di *C. parapsilosis* mostrano una certa variabilità nella produzione di biofilm, mentre i ceppi di *C. orthopsilosis* risultano prevalentemente non produttori e nessuno dei ceppi di *C. metapsilosis* è risultato capace di produrre biofilm.

[1] Tavanti A., A. Davidson, N.A.R. Gow, M.C.J. Maiden, and F.C. Odds. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*, spp. nov., to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 284-292, 2005.

## DETERMINAZIONE DI CLOSTRIDIUM BOTULINUM TIPO A MEDIANTE PCR

Fabrizio Anniballi, Elisabetta Delibato, Lucia Fenicia, Dario De Medici & Paolo Aureli  
Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari  
Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il botulismo è una grave sindrome neuroparalitica conseguente l'azione di neurotossine botuliniche (BoNTs) che agiscono a livello presinaptico bloccando il rilascio dell'acetilcolina e di conseguenza la contrazione muscolare.

Esistono sette differenti sierotipi (A-G) di BoNTs, la cui dose letale per l'uomo varia da 0,2 a 2,0 µg/kg.

Oltre al *Clostridium botulinum*, sono state identificate altre due specie di clostridi neurotossigeni, in particolare il *Clostridium baratii* (negli US e in Ungheria) ed il *Clostridium butyricum* (in Italia, Cina ed India). La diagnosi di laboratorio di botulismo, prevede l'identificazione della tossina botulinica nonché quella di clostridi neurotossigeni in campioni biologici ed alimentari. Considerando le gravi implicazioni che il botulismo ha sempre rivestito per la salute umana ed in relazione anche al più recente rischio correlato ad un eventuale uso della tossina botulinica quale arma biologica, il metodo di ricerca deve soddisfare particolari criteri di specificità, sensibilità e rapidità.

In relazione a tali problematiche, la ISO ed il CEN in ambito europeo hanno recentemente istituito gruppi di lavoro per la standardizzazione di metodi alternativi per la ricerca del *C. botulinum* negli alimenti mediante tecniche biomolecolari quali la PCR. Nell'ambito poi dei diversi sierotipi di BoNT, è generalmente accettato che la tossina tipo A provochi nell'uomo una forma di malattia più grave ed in effetti anche in Italia, dove i casi di botulismo sono correlati per oltre il 90 % al tipo B e sono generalmente di media gravità, gli unici casi mortali sono stati sempre correlati al tipo A.

In letteratura sono stati descritti diversi protocolli di PCR per la determinazione dei geni che codificano per le tossine botuliniche, ma molti di questi si sono dimostrati inefficaci a determinare tutti i ceppi di *C. botulinum* tipo A, inoltre tali metodi non prevedono l'inclusione di un controllo interno di amplificazione per evidenziare falsi negativi.

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di determinare dei primers idonei alla determinazione di tratti conservati del genoma dei ceppi di *C. botulinum* tipo A riportati in GenBank. La specificità di tali primers è stata determinata utilizzando 64 ceppi di *C. botulinum* tipo A, 39 ceppi di *C. botulinum* tipo B, D, E, F, 14 ceppi competitori non neurotossigeni, per la determinazione di *C. botulinum* tipo A mediante reazione di PCR, associata ad un controllo interno competitivo.

I primers proposti hanno dimostrato avere il 100 % di specificità verso i ceppi testati.

## ANALISI DEL FATTORE DI VIRULENZA INTERNALINA IN CEPPI CLINICI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLATI IN ITALIA: RISULTATI PRELIMINARI

Francesca Floridi, Giovanna Franciosa, Paolo Aureli  
Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari  
Istituto Superiore della Sanità, Roma

Il patogeno alimentare *Listeria monocytogenes* ha la capacità di attraversare la barriera intestinale, placentare ed emato-encefalica dell'organismo umano, causando rispettivamente gastro-enterite, infezioni materno-fetali e meningocelalite. Questa proprietà è dovuta principalmente all'interazione di una proteina di superficie di *L. monocytogenes*, l'internalina (peso molecolare 80 kDa), con il suo recettore nell'uomo, l'E-caderina, presente sulle cellule epiteliali. A causa di mutazioni intra-geniche, alcuni ceppi di *L. monocytogenes* producono forme troncate di internalina che sono inattive: la maggior parte dei ceppi che le produce è stata isolata da portatori asintomatici. Un recente studio realizzato in Francia ha tuttavia evidenziato che, pur raramente, anche ceppi implicati in casi clinici di listeriosi possono produrre internalina troncata: tali ceppi, comunque, erano associati a casi di batteriemia, più che a casi di listeriosi invasiva vera e propria. In questo lavoro, abbiamo analizzato mediante immunoblotting l'internalina di 34 ceppi di *L. monocytogenes* di origine clinica. Tra questi, sono stati inclusi 5 ceppi isolati da altrettanti casi di listeriosi gastro-enterica, due dei quali avvenuti in Italia, ed altri tre in Danimarca, Canada e Stati Uniti, rispettivamente; un ceppo (LO28) noto produttore di una delle forme troncate d'internalina (47 kDa) è stato utilizzato come riferimento. I ceppi sono stati coltivati in brodo, quindi sono state estratte le proteine del supernatante di ciascuna brodo-coltura, dove l'internalina troncata si trova in quantità maggiori. Le frazioni proteiche sono state separate mediante SDS-PAGE, trasferite su membrane di nitrocellulosa, e ibridizzate con anticorpi monoclonali specifici per l'internalina. Le proteine ibridizzate sono state identificate mediante l'uso di anticorpi secondari coniugati alla perossidasi, e di un kit per la rivelazione dell'attività perossidasi. I risultati hanno evidenziato che 4 dei 34 ceppi di *L. monocytogenes* saggiati producono una forma troncata d'internalina simile a quella sintetizzata dal riferimento LO28. Due dei ceppi erano stati isolati da casi di listeriosi gastroenterica, altri due da casi di listeriosi invasiva: questo risultato conferma che l'internalina potrebbe essere coinvolta nella diversità delle forme cliniche di listeriosi, ma che altri fattori di virulenza probabilmente intervengono nel complesso rapporto ospite-patogeno.

## PROFILI MOLECOLARI E SIEROTIPI DI CEPPI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLATI DA CAMPIONI ALIMENTARI, AMBIENTALI E CLINICI NEL CORSO DEL 2002-2003

Paolo Aureli, Alfonsina Fiore, Maria Claudia D'Ottavio, Antonietta Gattuso, Mariella Casale, Monica Gianfranceschi  
Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari  
Istituto Superiore di Sanità - Roma

Nell'ambito del Progetto "Sorveglianza della Listeriosi", svolto in collaborazione con il Centro Nazionale per l'Epidemiologia, la Sorveglianza e la Prevenzione della Salute dell'Istituto Superiore di Sanità e del Progetto "ListerInet", condotto in collaborazione con gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali, sono stati inviati al Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati da campioni clinici, alimentari ed ambientali. Altri ceppi alimentari ed ambientali sono stati isolati nello stesso periodo nel corso di due sorveglianze su prodotti carnei trasformati e su prodotti lattiero-caseari.

Tutti i ceppi sono stati sottoposti a caratterizzazione genotipica mediante Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) e a tipizzazione sierologica mediante Kit commerciale.

L'elaborazione dei profili molecolari ha permesso di effettuare una prima suddivisione dei ceppi in diversi pulsotipi e di evidenziare omologie tra ceppi isolati da diverse categorie di campioni.

Per quanto riguarda la tipizzazione sierologica fra i campioni alimentari prevalgono i sierotipi 1/2c (45.3%) e 1/2a (30.9%) e mentre i sierotipi 1/2a (43.9%) e 1/2b (19.5%) sono predominati nei campioni clinici.

I risultati di questo studio concordano con quelli ottenuti in altre parti del mondo dove non si evidenzia una stretta correlazione fra ceppi clinici ed alimentari.

## ATTIVITA' IN VITRO DI CARVACROLO E TIMOLO NEI CONFRONTI DEL BIOFILM PRODOTTO DA STAFILOCOCCI

A. Nostro<sup>1</sup>, A. Sudano Roccaro<sup>2</sup>, G. Bisignano<sup>1</sup>, A. Marino<sup>1</sup>, M. A. Cannatelli<sup>1</sup>, F. Pizzimenti<sup>1</sup>, F. Procopio<sup>1</sup>, A.R. Blanco<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Dipartimento Farmaco-Biologico, Sezione Microbiologia. Università degli Studi di Messina Viale S.S. Annunziata 98168 Messina, Italy.

<sup>2</sup>Dipartimento R&D, SIFI S.p.A, Via Ercole Patti 36, Lavinaio, 95020 Catania, Italy.

Gli Stafilococchi sono importanti patogeni nosocomiali abili a formare biofilm. Di recente la comunità scientifica ha rivolto l'attenzione verso lo studio delle proprietà antimicrobiche degli oli essenziali. Alcune ricerche suggeriscono un loro possibile ruolo come rimedi per il trattamento delle infezioni, tuttavia, poche sono le segnalazioni riguardanti l'attività nei confronti dei biofilm batterici. Carvacrolo e timolo sono i componenti principali dell'olio essenziale di origano, noti per la loro forte attività antimicrobica. Scopo del presente studio è quello di valutare gli effetti di carvacrolo e timolo sul biofilm prodotto da isolati clinici di *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. In una prima fase del lavoro, i ceppi sono stati caratterizzati mediante individuazione di alcuni geni coinvolti nella formazione del biofilm (*icaA* e *icaD*) e mediante analisi quantitativa del biofilm sviluppato su micropiastre in polistirene. Successivamente è stata studiata la capacità degli oli di interferire con l'adesione valutando gli effetti di concentrazioni subinibenti e rilevando le concentrazioni inibenti (BIC) ed eradicanti (BEC) il biofilm. I risultati chiaramente mostrano che carvacrolo e timolo determinano una riduzione di circa il 50-60% del biofilm in termini di biomassa prodotta e inibiscono la crescita delle cellule inglobate nel biofilm con valori di BIC/BEC compresi rispettivamente nei range 0.0312÷0.125/0.125÷0.500% (v/v).

## IDENTIFICAZIONE DEI CLONI EPIDEMICI I E II FRA I CEPPI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* DI SIEROTIPO 4b ISOLATI IN ITALIA

Giovanna Franciosa, Concetta Scalfaro, Antonella Maugliani, Francesca Floridi, Paolo Aureli  
Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari  
Istituto Superiore della Sanità, Roma

*Listeria monocytogenes* è l'agente eziologico della listeriosi umana, una seria infezione alimentare che colpisce individui suscettibili, in particolare donne in gravidanza, neonati, anziani e persone immuno-compromesse; può anche causare gastroenterite febbrile in adulti sani. Fra i 13 sierotipi noti di *L. monocytogenes*, il sierotipo 4b è quello maggiormente implicato nella malattia umana, nel mondo. Ceppi di questo sierotipo mostrano un elevato grado di omologia genetica; tuttavia, alcuni ceppi coinvolti in casi epidemici di listeriosi in Europa e in Nord America condividono caratteristiche genetiche peculiari, distinte da ogni altro ceppo di *L. monocytogenes*. Essi vengono pertanto definiti "cloni epidemici": due diversi cloni epidemici sono stati individuati, il clone epidemico I (ECI) ed il clone epidemico II (ECII). Il recente sequenziamento del genoma di due ceppi rappresentativi dei 2 differenti cloni ha permesso l'identificazione dei markers genetici specifici per ciascun clone. In questo lavoro, abbiamo studiato la prevalenza dei cloni ECI ed ECII in una popolazione di 94 ceppi di *L. monocytogenes* 4b isolati per la maggior parte in Italia, mediante la ricerca di markers genetici selezionati, tipici per i due cloni. Dei 94 ceppi totali sottoposti all'analisi, 50 erano di origine alimentare, 36 di origine clinica, e 5 di origine ambientale. I rimanenti 3 ceppi erano di riferimento, rappresentativi dei cloni ECI ed ECII. Il sierotipo di tutti i ceppi è stato dapprima confermato mediante l'amplificazione di un frammento genico contenente la regione *gltA*, specifica per il sierotipo 4b. I markers utilizzati per l'identificazione dei cloni epidemici erano le regioni genetiche 85M, 17B, e 133, per il clone ECI; e SF7, SF18, 1365-1366, per il clone ECII. Sedici ceppi saggiati hanno prodotto risultati simili a quelli ottenuti con i 2 ceppi di riferimento ECI: 6 erano clinici, 9 alimentari (2 dei quali dalla Jugoslavia), 1 ambientale. Diciassette ceppi, invece, hanno prodotto pattern simili a quelli del riferimento ECII: 9 clinici, 7 alimentari (di cui uno dalla Francia ed uno dalla Jugoslavia), ed 1 ambientale. I risultati dimostrano un'elevata prevalenza dei cloni epidemici di *L. monocytogenes* 4b nel nostro Paese, in particolare fra i ceppi clinici: quest'ultima osservazione è in accordo con l'ipotesi corrente che questi ceppi potrebbero possedere un più elevato potenziale patogeno.

## STRATEGIE ALTERNATIVE PER LA PROFILASSI DELLE INFEZIONI SOSTENUTE DA *CANDIDA ALBICANS*. CONTRATTE IN AMBIENTE OSPEDALIERO MEDIANTE ISOTIOSEMICARBAZONI CICLICI

M. Saggi<sup>a</sup>, M.C. Cardia<sup>b</sup>, L. Chisu<sup>a</sup>, D. Maccioni<sup>a</sup>, S. Magnapane<sup>a</sup>, D. Cabitza<sup>a</sup>, B. Saggi<sup>c</sup>, E. Maccioni<sup>b</sup>, A. De Logu<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Sezione di Microbiologia Medica, Università di Cagliari

<sup>b</sup>Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico, Università di Cagliari

<sup>c</sup>Laboratorio di Analisi Ospedale SS. Trinità, Cagliari

Le micosi sostenute da *C. albicans* contratte in ambiente ospedaliero costituiscono un problema di grande rilievo. Il 50% dei pazienti ospedalizzati sono sottoposti a cateterizzazione e la contaminazione dei cateteri può costituire il punto di partenza per una candidosi generalizzata. *C. albicans* presenta infatti la capacità di formare biofilm su mucose, tessuti e dispositivi medici. In questi casi si ricorre generalmente alla profilassi mediante derivati azolici. Poiché questi esplicano solo un effetto fungistatico, per il trattamento delle infezioni sostenute da *C. albicans* nel paziente immunodepresso si utilizza, nonostante la sua elevata tossicità, l'AMB. Precedenti studi hanno tuttavia dimostrato che la pre-esposizione di cellule planctoniche di *C. albicans* al fluconazolo induce una resistenza fenotipica transitoria all'AMB che consente di sopportare concentrazioni 100 volte superiori a quelle che in condizioni normali determinano una inibizione dello sviluppo. I risultati ottenuti indicano che la pre-esposizione al fluconazolo induce una resistenza fenotipica nei confronti dell'AMB anche in cellule sessili di biofilm, inducendo una significativa riduzione dell'efficacia in caso di successivo trattamento terapeutico. L'impiego di derivati ciclici isotiosemicarbazonici induce una riduzione significativa dello sviluppo di biofilm di *C. albicans*, seppure a concentrazioni superiori ai valori di MIC determinati nei confronti di cellule planctoniche. Inoltre la pre-esposizione del biofilm a tali derivati determina un aumento della sensibilità in caso di successiva esposizione all'AMB. I risultati ottenuti indicano pertanto che l'impiego del fluconazolo per la profilassi delle infezioni fungine contratte in ambiente ospedaliero deve essere evitato nel paziente immunocompromesso e sottolineano la necessità dello sviluppo di nuove farmaci fungicidi a bassa tossicità in grado di inibire lo sviluppo di biofilm di *C. albicans*.

## CARATTERIZZAZIONE DI UN CEPPLO INVASIVO DI *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* PORTATORE DEL GENE *erm(A)*

Camilli R.<sup>1</sup>, Del Grosso M.<sup>1</sup>, D'Ambrosio F.<sup>1</sup>, Monaco M.<sup>1</sup>, Conte M.<sup>2</sup>, Pantosti A.<sup>1</sup>

Dipartimento MIPI, Istituto Superiore di Sanità<sup>1</sup>, Roma e Ospedale Cotugno<sup>2</sup>, Napoli.

La resistenza ai macrolidi di *Streptococcus pneumoniae* in Italia ha subito un notevole incremento raggiungendo una frequenza di resistenza intorno al 35%. Questa resistenza è dovuta principalmente alla presenza dei geni *erm(B)* o *mef(A)*. In questo studio descriviamo, per la prima volta in Italia, un ceppo invasivo di *S. pneumoniae* (AP200) la cui resistenza alla eritromicina è determinata dalla presenza del gene *erm(A)*. Il ceppo AP200, isolato nel 2003 dal liquor di un paziente di Napoli di 32 anni affetto da meningite, è stato analizzato sia fenotipicamente, mediante la determinazione della sensibilità agli antibiotici (E-test) e la sierotipizzazione (reazione di Quellung), che genotipicamente, mediante le tecniche di tipizzazione molecolare PFGE e MLST. La presenza del gene *erm(A)* è stata dimostrata mediante PCR e sequenziamento. Per determinare i siti di inserzione del gene *erm(A)* nel cromosoma batterico è stata allestita una PCR inversa. Il ceppo, che appartiene al sierotipo 11A, ha mostrato resistenza alla eritromicina (MIC=4 µg/ml), resistenza inducibile alla clindamicina (dimostrata mediante test del doppio dischetto) e sensibilità alla penicillina e tetraciclina. Entrambe le tecniche di tipizzazione molecolare, PFGE e MLST, hanno evidenziato la correlazione genetica di AP200 con altri ceppi di *S. pneumoniae* appartenenti al sierotipo 11A. Il sequenziamento del frammento amplificato tramite PCR inversa ha permesso di analizzare circa 4500 nucleotidi fiancheggiando il gene dimostrando la presenza di ORF omologhe a trasposasi di altre specie batteriche Gram-positivo. Mediante PCR è stato verificato che in ceppi di *Streptococcus pyogenes* portatori di *erm(A)*, il gene è fiancheggiato dalle stesse sequenze. Il gene *erm(A)* è raro in *S. pneumoniae* e finora è stato segnalato solo in ceppi di *S. pneumoniae* sierotipo 11A isolati da portatori in Grecia e in un solo ceppo invasivo sierotipo 4 isolato in Danimarca. Al contrario *erm(A)* è relativamente frequente in *S. pyogenes* e il gene potrebbe essere stato trasferito da questa specie a *S. pneumoniae*.

## PRESENZA DI PAPPILLOMAVIRUS UMANO (HPV) IN TUMORI POLMONARI NON A PICCOLE CELLULE

Laura Giuliani, Marco Ciotti, Arrigo Benedetto, Cartesio Favalli.

Laboratorio di Microbiologia e Virologia Clinica, Policlinico Universitario Tor Vergata, Viale Oxford, 81-00133 Roma, Italia.

**Razionale e obiettivi:** La presenza di HPV-DNA è stata rilevata in circa il 20% dei carcinomi bronchiali. Gli HPV16 e 18 sono i tipi oncogenici più frequentemente riscontrati, mentre solo occasionalmente sono state riportate infezioni multiple. Nel nostro studio 38 casi di carcinomi polmonari non a piccole cellule (NSCLC) sono stati analizzati per la presenza di HPV-DNA. In caso di positività si è ricercata la presenza dell' mRNA degli oncogeni E6 e E7.

**Metodi :** HPV-DNA è stato ricercato mediante PCR utilizzando primers specifici per la regione E6/E7 degli HPV16, 18 e 31. Tutti i casi positivi all' HPV sono stati indagati per la presenza di mRNA E6 e E7 specifici mediante RT-PCR

**Risultati e conclusioni:** L'analisi di PCR ha evidenziato la presenza di HPV-DNA in 6 casi su 38 ( 3 adenocarcinomi e 3 carcinomi epidermoidi). Questo dato è stato inoltre confermato a livello di mRNA HPV specifici, ciò indicando la presenza attiva del virus nel tessuto. Tutti i casi positivi erano infettati da un singolo genotipo tranne uno che conteneva un doppio genotipo (HPV16/18). Approfondimenti sono in corso su una più ampia casistica di tumori polmonari.

## STRATEGIE ATTUALI PER LA RICERCA ED IDENTIFICAZIONE DI MICRORGANISMI DI INTERESSE ALIMENTARE

L. Aquilanti, C. Garofalo, F. Clementi

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università Politecnica delle Marche

[L.aquilanti@univpm.it](mailto:L.aquilanti@univpm.it)

E' noto che le tecniche tradizionali di studio di microrganismi negli alimenti, che utilizzano opportuni terreni colturali, sono in grado di rilevare soltanto una porzione della complessa popolazione microbica. Sfuggono a tali metodi i microrganismi vitali non coltivabili, la cui presenza negli alimenti è frequentemente correlata a stress di varia natura, come scarsità di nutrienti, basse temperature, specifici trattamenti. Per superare questa difficoltà, sono stati sviluppati numerosi metodi, che prescindono dalla coltivazione dei microrganismi. La maggior parte di tali metodi si basa sulla PCR che, per l'elevata sensibilità e specificità, è uno degli strumenti più efficaci per lo studio della biodiversità e della evoluzione di popolazioni microbiche. Tra le applicazioni già da tempo consolidate, il sequenziamento di prodotti di PCR per studi tassonomici e filogenetici. Di più recente utilizzo, le tecniche di PCR-DGGE e PCR-TGGE, basate sull'amplificazione di marcatori molecolari, seguita da elettroforesi in gradiente denaturante o di temperatura, che permettono la separazione degli ampliconi sulla base sia della lunghezza, sia della sequenza nucleotidica. Le tecniche basate sulla PCR presentano, tuttavia, il limite di fornire risultati qualitativi o semiquantitativi. Questo limite, aggirato inizialmente attraverso l'utilizzo di standard esterni ed interni (PCR competitiva), è stato successivamente superato attraverso l'introduzione della tecnologia real-time, utilizzata ad esempio per il rilevamento, in matrici alimentari, di patogeni come *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter jejuni*. Tale tecnologia presenta specifici vantaggi quali l'eliminazione dei passaggi di post-amplificazione, la maggiore automazione, l'analisi contemporanea di un elevato numero di campioni. Un ulteriore inconveniente delle tecniche convenzionali di PCR è l'incapacità di distinguere tra cellule vitali e non vitali. Poiché l'm-RNA presenta una *turn-over* cellulare estremamente più veloce rispetto al DNA, sono state recentemente sviluppate tecniche basate sulla RT-PCR, anche in tecnologia real-time. Enormi potenzialità sono inoltre offerte dall'impiego dei *microarrays*, ancora poco utilizzati in campo alimentare, per l'elevato costo delle attrezzature. Tra le tecniche non basate sulla PCR, sono infine disponibili tecniche fluorimetriche, come la FISH, e citofluorimetriche, utilizzate rispettivamente per la localizzazione dei microrganismi negli alimenti e la valutazione del loro stato fisiologico.

## ERBE MEDICINALI COME ANTIBATTERICI: QUALI EVIDENZE?

Gioacchino Calapai

Dipartimento Clinico Sperimentale di Medicina e Farmacologia, Università di Messina.

Sebbene i prodotti naturali e in particolare quelli di origine vegetale, non siano privi di effetti collaterali, una buona parte della popolazione occidentale preferisce utilizzarli a scopo terapeutico in alternativa ai farmaci di sintesi. Numerosissimi estratti vegetali sono stati testati per la loro attività antimicrobica in vitro e negli anni più recenti è stata studiata in particolare l'attività antibatterica degli oli essenziali. Ma, nonostante la loro lunga storia e la loro attuale popolarità, soltanto alcune piante medicinali sono state testate in maniera rigorosa per la loro efficacia antimicrobica nella pratica clinica. Uno dei fattori che hanno maggiormente contribuito a determinare questa situazione è sicuramente la mancanza di diritti di proprietà (brevetti) sulle erbe medicinali. Un'altra ragione è che chi si è occupato in passato di fitoterapia ha rinunciato, basandosi sulla esperienza popolare e su impressioni di efficacia, a ricercare chiare dimostrazioni scientifiche. A complicare ulteriormente le cose, c'è il dato che diversi studi clinici sono stati in passato pubblicati su riviste scientifiche non contemplate dalle moderne banche dati oggi usualmente consultate dalla comunità scientifica e, inoltre, risultati negativi possono non essere stati resi noti.

Le evidenze scientifiche sinora raccolte suggeriscono che è possibile ottenere effetti benefici utilizzando alcuni estratti di origine vegetale con attività antibatterica. Ad esempio, da studi clinici condotti con il cosiddetto tè nero (*Thea assamica*) nella cura dell'impetigine (da *Stafilococcus aureus* e da *Streptococcus pyogenes*) e con l'olio di Melaleuca o di *Ocimum gratissimum* nel trattamento dell'acne emergono risultati incoraggianti a volte sovrapponibili a quelli ottenuti con i farmaci di sintesi. Al contrario, studi condotti per valutare l'efficacia clinica di estratti a base di aglio sulla eradicazione dell'*Helicobacter pylori* non hanno riportato effetti significativi. In ogni caso, non sono moltissimi gli studi clinici pubblicati fino ad oggi e troppo spesso, specie quelli pubblicati in passato, contengono errori metodologici e/o sono condotti su un numero esiguo di soggetti. Per queste ovvie ragioni, giudizi definitivi sulla efficacia antimicrobica delle piante medicinali più promettenti potranno essere emessi solo se esse saranno studiate con sperimentazioni cliniche controllate.

## METODI AVANZATI PER LA DIAGNOSI DI LABORATORIO DELLE PARASSITOSI DI INTERESSE MEDICO.

Adriana Calderaro.

*Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma.*

**Introduzione.** Diversi metodi molecolari avanzati si dimostrano sempre più utili nella diagnosi di parassitosi, quando affiancati a quelli tradizionali. In questo studio presentiamo i risultati ottenuti durante la messa a punto, la validazione e l'applicazione di metodi avanzati alla diagnosi di laboratorio di parassitosi causate da protozoi (*Entamoeba histolytica*, *E. dispar*, plasmodi della malaria, *Toxoplasma gondii* e *Leishmania* spp.).

**Infezioni da *E. histolytica* e *E. dispar*.** La diagnosi d'infezione da *E. histolytica* è effettuata mediante metodo tradizionale (esame microscopico e colturale) affiancato da PCR (convenzionale e Real-time). Solo grazie all'uso dei metodi molecolari sono stati diagnosticati casi di amebiasi, altrimenti misconosciuti; inoltre, con questi metodi molecolari è stato possibile identificare *E. dispar*, ameba intestinale non patogena morfologicamente identica a *E. histolytica*, in campioni di feci di pazienti con sospetta parassitosi intestinale.

**Infezioni da plasmodi della malaria [*P. falciparum* (*Pf*), *P. vivax* (*Pv*), *P. malariae* (*Pm*) e *P. ovale* (*Po*)].** La diagnosi di malaria mediante esame microscopico è affiancata da una Real-time PCR (18S rDNA) per *Pf*, *Pv* e *Po*, da noi precedentemente messa a punto e valutata, che si è rivelata sensibile, soprattutto nei casi di bassa parassitemia, specifica, consentendo di diagnosticare infezioni miste, rapida e di semplice esecuzione ed automatizzata. Per questi vantaggi la Real-time PCR ha sostituito la nested-PCR convenzionale per l'identificazione di *Pf*, *Po*, e *Pv* e, attualmente, quest'ultima è in uso solo per la ricerca e identificazione di *P. malariae*.

**Infezioni da *T. gondii*.** La diagnosi di toxoplasmosi con metodi diretti si effettua mediante PCR convenzionale (nested-PCR) e Real-time PCR (sistema Taqman e Sistema FRET) aventi rispettivamente 3 diversi bersagli genici nel DNA di *T. gondii*. Solo grazie all'uso dei metodi molecolari è stato possibile diagnosticare un caso di infezione cerebrale in un paziente immunodepresso con sierologia di dubbia interpretazione ed escludere l'infezione in casi di sospetta toxoplasmosi congenita.

**Infezioni da *Leishmania* spp.** E' stata valutata, in termini di specificità e sensibilità, una Real-time PCR per la diagnosi di leishmaniosi cutanea e viscerale. Il sistema si è rivelato altamente sensibile e specifico ed è vantaggiosamente affiancato dall'esame colturale, permettendo una diagnosi più rapida e accurata.

## IDATIDOSI: UN UPGRADE

Giuseppe Cringoli

*Settore di Parassitologia Veterinaria e Malattie Parassitarie, Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Napoli "Federico II"*

La idatidosi (echinococcosi cistica) è una zoonosi cosmopolita causata dagli stadi larvali del cestode *Echinococcus granulosus*. Ospiti definitivi di questo parassita sono carnivori domestici e selvatici -il cane assume un ruolo di primaria importanza- che si infestano con la ingestione di organi (soprattutto fegato e polmone) contenenti le forme larvali (idatidi o cisti idatidee) con protoscolici vitali. *E. granulosus* non è una specie omogenea; a tutt'oggi sono stati riconosciuti 10 genotipi (G1-ovino, G2-ovino Tasmania, G3-bufalo, G4-equino, G5-bovino, G6-cammello, G7-suino, G8-cervide, G9-uomo e G10-cervide finnoscandinavo), con differenze di sequenza in alcuni geni che verosimilmente ne condizionano il ciclo biologico, la specificità d'ospite, la patogenicità, le capacità antigeniche e la sensibilità ai chemioterapici. Nell'uomo, la maggior parte delle infezioni sono legate al genotipo G1; tuttavia, sono possibili infezioni con i genotipi G2, G3, G5, G6, G7 e G8. Dal 1998 il gruppo di ricerca del Settore di Parassitologia Veterinaria e Malattie Parassitarie dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" ha attivato una serie di ricerche finalizzate alla valutazione della presenza e diffusione di questa parassitosi sull'intero territorio regionale, producendo anche mappe delle aree a rischio mediante l'utilizzo dei *Geographical Information Systems*. E' emersa una notevole diffusione di questa parassitosi in diverse specie animali (bovini, bufali, ovini, caprini e suini), con valori di prevalenza tutt'altro che trascurabili (es., 14.8% nei bovini e 10.7% nei bufali). Le indagini molecolari su idatidi prelevate da bovini e bufali hanno consentito la identificazione dei genotipi G1 e G3, genotipi ad elevata capacità zoonosica. Inoltre, per indagare sulla presenza e diffusione della idatidosi nell'uomo in Campania, in collaborazione con il Dipartimento di Medicina Pubblica e della Sicurezza Sociale (Sezione di Malattie Infettive) della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" e con l'indispensabile supporto territoriale della Bayer Italia spa, è stata attivata una *questionnaire survey* presso i medici di base della nostra regione. Dai risultati preliminari è emerso che il 30% circa dei medici intervistati hanno/hanno avuto pazienti affetti da idatidosi. Da tutto ciò scaturisce che nella nostra regione la idatidosi è una diffusa parassitosi animale ed un'importante zoonosi.

## IMMUNITA' ANTI-CANDIDA NELLA VAGINITE

F. De Bernardis<sup>1</sup>, M. Boccanera<sup>1</sup>, S. Arancia<sup>1</sup>, R. Lucciarini<sup>2</sup>, G. Santoni<sup>2</sup>, A. Cassone<sup>1</sup>.

Istituto Superiore di Sanità, Roma<sup>1</sup>, Università degli Studi di Camerino, Camerino<sup>2</sup>

La candidosi vulvovaginale é una frequente infezione che colpisce molte donne ed alcune in forme ricorrenti e refrattarie alla terapia antimicotica. Tuttavia la sua patogenesi non è chiara. Abbiamo studiato la risposta anti-*Candida* a livello delle mucose. In particolare, nel modello di vaginite sperimentale nella ratte abbiamo evidenziato che anticorpi anti-*Candida* ed immunità cellulosa mediata vengono indotti a livello vaginale e che questa immunità, non è associata a risposte periferiche, richiede la risposta ad antigeni T-dipendenti, è mediata da anticorpi Ig G ed Ig A contro alcuni fattori di virulenza del fungo (adesine mannoproteiche ed aspartyl-proteinasi) ed è trasferibile da linfociti vaginali e non da quelli periferici. In particolare è stato investigato il ruolo protettivo di differenti classi di linfociti mediante trasferimento adottivo di linfociti vaginali (LV) totali o purificati in T CD3<sup>+</sup>, o B CD5<sup>+</sup>. Gli animali inoculati endovena con LV totali o con cellule T CD3<sup>+</sup> derivanti da ratte immuni (inoculate 3 volte consecutive con *C.albicans*) hanno mostrato una più rapida e significativa eliminazione delle Candide dalla vagina rispetto agli animali trattati con LV provenienti da animali non immunizzati. Anche il trasferimento di linfociti B CD5<sup>+</sup> ha conferito protezione.

Il trasferimento di cellule T CD4<sup>+</sup> ha conferito alle ratte una maggiore protezione dall'infezione vaginale con *C.albicans* rispetto al trasferimento di cellule T CD8<sup>+</sup>.

In conclusione, linfociti prelevati dalle ratte immunizzate sono attivi in quest'ordine: linfociti T CD4<sup>+</sup> > linfociti B CD5<sup>+</sup> > linfociti T CD8<sup>+</sup>. Inoltre, i linfociti CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> sono stati separati in base al recettore CD25<sup>+</sup> e quindi trasferiti. Non sono state notate differenze nella protezione tra i linfociti con CD25 e quelli senza.

Questi studi dimostrano l'attivazione dei linfociti vaginali e che la risposta anti-*Candida* cellulosa mediata viene specificatamente indotta ed espressa in loco a livello vaginale senza indurre una risposta periferica. In particolare, le cellule T CD4<sup>+</sup> e i linfociti B CD5<sup>+</sup> svolgono un ruolo preminente. Tra i linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> non è stata evidenziata una popolazione con attività regolatoria.

In complesso i risultati ottenuti enfatizzano il ruolo protettivo dell'immunità sia umorale che cellulosa mediata e costituiscono una base per una possibile strategia di vaccinazione o immunoterapia delle forme di candidiasi vaginali ricorrenti e refrattarie alla terapia con antimicotici.

## REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA E VIRULENZA IN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Riccardo Manganelli

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche Università di Padova Via Gabelli 63 Padova

La tubercolosi (TB) rappresenta ancora uno dei maggiori problemi sanitari a livello planetario. Si calcola che ogni anno circa 55 milioni di persone vengano infettate da *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) e che i casi annuali di TB attiva siano intorno ai 10 milioni.

Durante l'infezione *Mtb* è esposto a molteplici situazioni ambientali alle quali si adatta principalmente mediante regolazione trascrizionale. Recentemente, con l'aiuto della tecnica dei *microarray* a DNA è stato possibile analizzare la risposta trascrizionale di *Mtb* all'ambiente intracellulare, nonché il ruolo di alcuni specifici regolatori. Tra i risultati più interessanti, la scoperta del regulone Dos e quella di un *network* di fattori sigma.

DosR risponde alla inibizione della respirazione aerobia (dovuta a carenza di ossigeno o alla presenza di basse concentrazioni di ossido nitrico) ed attiva la trascrizione di 40 geni, molti a funzione sconosciuta e sembra essere responsabile della entrata di *Mtb* nello stato di dormienza che caratterizza la fase latente della malattia (1). Praticamente questo regolatore rappresenta un sensore per rilevare lo stato di attivazione dei macrofagi (presenza di ossido nitrico) e permetterebbe ai batteri di entrare in uno stato di quiescenza nel quale essi sono resistenti all'attività battericida dei macrofagi attivati (2).

Il genoma di *Mtb* codifica per 13 fattori sigma, di cui 10 appartengono alla famiglia degli *ECF* (*Extra-Cytoplasmic Function*) (3). Almeno due di questi (SigE e SigH) sono indotti da *Mtb* immediatamente dopo l'ingresso nel macrofago e sono essenziali per la virulenza (3-4). I geni sotto il controllo trascrizionale di questi due fattori sigma e di SigL sono stati identificati mediante l'uso di *microarray* a DNA (5-6). Da tali risultati si è iniziato a delineare la presenza di un *network* di regolazione tra questi 3 fattori sigma *ECF* ed un quarto fattore sigma (SigB) appartenente alla classe dei fattori sigma principali.

Bibliografia:

Park *et al.* (2003) *Mol. Microbiol.* **48**:833-843.

Voskuil *et al.* (2003) *J. Ex Med.* **198**:705-713.

Manganelli *et al.* (2004) *J. Bacteriol.* **186**:895-902.

Manganelli *et al.* (2004) *Infect. Immun.* **72**:3038-3041.

Manganelli *et al.* (2001) *Mol. Microbiol.* **41**:423-427.

Manganelli *et al.* (2002) *Mol. Microbiol.* **45**:365-374.

Dainese *et al.* Inviato per la pubblicazione.

## **PATOGENICITA' DI *SHIGELLA FLEXNERI*: RUOLO DEL GENE *apy* NELLA LOCALIZZAZIONE DI IcsA SULLA SUPERFICIE BATTERICA.**

F. Del Chierico e M. Nicoletti

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università "G. D'Annunzio" di Chieti.

Il meccanismo di patogenicità di *Shigella flexneri* è un fenomeno complesso che richiede l'espressione coordinata di numerosi geni localizzati sia sul cromosoma che sul plasmide di virulenza. In risposta a segnali provenienti dal contatto con la cellula ospite, *S. flexneri* attiva il sistema di secrezione di tipo III (SSTT) che porta ad una up-regolazione dell'espressione di numerosi geni di virulenza alcuni dei quali codificano proteine (effettori) che sono secrete all'interno della cellula ospite in modo da sovvertire a proprio vantaggio la fisiologia cellulare. L'espressione del gene plasmidico *apy* (*phoN2*), che codifica una ATP-difosfoidrolasi (apirasi) periplasmica, un enzima in grado di idrolizzare i dNTP in dNDP e questi nei corrispondenti dNMP e che fa parte insieme al gene *ospB* di un operone bicistronico, è up-regolata quando il SSTT è attivato. Al fine di valutare il ruolo di *apy* nel meccanismo di patogenicità di *S. flexneri*, abbiamo introdotto una delezione del gene strutturale nel ceppo di *S. flexneri* M90T. Il mutante ottenuto saggiato su monostrati confluenti di cellule HeLa e/o Caco-2, produce placche di dimensioni più piccole rispetto al ceppo parentale. Tale dato indicava che il gene *apy* è coinvolto nel meccanismo di patogenicità di *S. flexneri*, probabilmente nel passaggio della diffusione del microrganismo a cellule adiacenti. Infatti, l'analisi del mutante ha messo in evidenza che IcsA (la proteina di virulenza responsabile della diffusione del microrganismo all'interno della cellula ed a cellule adiacenti) è distribuita su tutta la superficie del batterio, invece che localizzata ad un polo, e che il mutante produce code di actina polimerizzata alterate rispetto al ceppo parentale. La mancanza di apirasi non influenza né il passaggio di IcsA sulla membrana esterna né la sua seguente digestione proteolitica da parte di IcsP (SopA), mentre appare responsabile dell'alterato profilo di virulenza visto che la complementazione del mutante con una copia del gene *apy* messo sotto il controllo di un promotore inducibile ripristina la formazione di placche wild-type, la localizzazione polare di IcsA e la produzione di code di actina analoghe a quelle prodotte dal ceppo parentale. La caratterizzazione del meccanismo attraverso il quale *apy* influenza la localizzazione polare di IcsA sulla superficie del batterio è di grande importanza per la comprensione di questo importante passaggio del meccanismo di patogenicità di *S. flexneri*.

## **QUALIFIED PRESUMPTION OF SAFETY: ORIENTAMENTI DELLA EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY RELATIVAMENTE ALL'IMPIEGO DI MICRORGANISMI IN ALIMENTI E MANGIMI.**

L. Morelli, P.S. Cocconcelli

Istituto di Microbiologia, Facoltà di Agraria U.C.S.C. Via Emilia Parmense 84, 29100 Piacenza

La necessità di una valutazione a livello europeo della sicurezza dei microrganismi utilizzati per la produzione di alimenti è stata evidenziata per la prima volta nel 2003 mediante un documento di lavoro, dal titolo "On a generic approach to the safety assessment of microorganisms used in feed/food and feed/food production" preparato congiuntamente dallo Scientific Committee on Animal Nutrition e dal Scientific Committee on Food and the Scientific Committee on Plants.

Questo documento introduceva il concetto di Qualified Presumption of Safety (QPS), da applicarsi a gruppi di microrganismi dotati di lunga storia di uso sicuro. Si proponeva di esentare da una specifica valutazione di sicurezza da parte dell'autorità europea competente (oggi l'EFSA) i ceppi batterici appartenenti a questi gruppi selezionati di microrganismi.

A partire da quell'iniziale documento un intenso lavoro di approfondimento del concetto di QPS è stato svolto dall'EFSA, per arrivare a formulare un sistema generale per l'approvazione, da parte dell'EFSA stessa, delle richieste di valutazione della sicurezza di microrganismi deliberatamente introdotti nella catena alimentare.

Fin dalla proposta originale la valutazione per l'assegnazione di un microrganismo alla categoria QPS si basava su 4 pilastri:

- Tassonomia** – si richiede una precisa identificazione tassonomica;
- Familiarità** - si tratta di stabilire se vi è una sufficiente quantità di conoscenze sul microrganismo; oggi questo principio è stato ridefinito come "Body of Knowledge" per una migliore identificazione del tipo di informazioni richieste;
- Patogenicità** – si tratta di stabilire se il gruppo tassonomico a cui appartiene il microrganismo contiene anche patogeni e se sì, si deve stabilire se vi siano sufficienti conoscenze per quanto riguarda le determinanti per la virulenza o la tossigenicità, al fine di consentire l'esclusione dal status di QPS dei ceppi patogeni;
- Uso finale** – si tratta di stabilire se il microrganismo entrerà direttamente come vivo e vitale nella catena alimentare o se verrà utilizzato per altri scopi.

Nel Dicembre 2004 EFSA ha organizzato un "Scientific colloquium" che ha riunito circa 100 esperti e che è servito a delimitare con maggiore precisione il concetto di QPS. In questo incontro il concetto di QOPS è stato ulteriormente precisato. Attualmente EFS ha ricevuto mandato di rendere operativo il concetto di QPS.

## ESPRESSIONE DI GENI DI VIRULENZA NELLE INFEZIONI DA *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Marco R. Oggioni, Claudia Trappetti, Francesco Iannelli, Susanna Ricci, Gianni Pozzi,  
*LAMMB, Dip. Biologia Molecolare, Università degli Studi di Siena*

In patogeni umani, come nel caso dello *Streptococcus pneumoniae*, la conoscenza dei pattern di espressione genica durante le fasi dell'infezione e disseminazione nell'organismo ospite è di fondamentale importanza, sia per lo sviluppo di tecniche da usare in diagnostica che per la terapia. A tal fine abbiamo sviluppato un protocollo di analisi mediante l'utilizzo di RT PCR real time quantitativa. Per monitorare l'espressione genica in pneumococco sono stati utilizzati tre distinti modelli di infezione in topi out-bred: meningite per inoculo intracranico, polmonite dopo inoculo intranasale e sepsi dopo inoculo endovenoso. I risultati hanno portato all'identificazione di due distinti pattern di espressione. Durante la sepsi i batteri mostrano un incremento dell'espressione dei geni per la tossina pneumolisina, *pspA*, ed il regolatore *hrcA*. Questo pattern di espressione è sovrapponibile a quello riscontrato in pneumococchi cresciuti in terreno liquido. Durante la polmonite e la meningite, invece, i geni espressi in maniera significativamente più alta rispetto al sangue sono le neuroamminidasi, le metalloproteasi e una serie di regolatori che includono *comE*, *comX*, *dtxR* e *mgrA*. I nostri dati mostrano come sia possibile caratterizzare specifici "modi di comportamento" di un batterio durante l'infezione tramite l'analisi dei pattern di espressione genica. Nel caso specifico i dati indicano come il pattern di espressione genica di pneumococco durante la sepsi equivale a quello in terreno liquido, mentre differisce da quello riscontrato in infezioni dei tessuti quali meningite e polmonite.

## NUOVI ANTIGENI PNEUMOCOCCICI E IMMUNITA'.

Samuele Peppoloni

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

*Streptococcus pneumoniae* è un batterio Gram-positivo che colonizza il nasofaringe e causa malattie invasive gravi, quali meningite, setticemia e polmonite, provocando la morte di circa un milione di bambini con meno di 5 anni di età ogni anno. L'alta mortalità è in parte dovuta alla diffusione di ceppi resistenti ai comuni antibiotici. Oltre ai bambini al di sotto di 2 anni, i gruppi a rischio sono gli anziani ed i pazienti con immunodeficienze. Negli ultimi decenni sono stati sviluppati vaccini basati sui polisaccaridi capsulari, la cui efficacia è tuttavia limitata a causa della scarsa immunogenicità, soprattutto nei bambini con meno di 24 mesi, dovuta al fatto che i polisaccaridi sono antigeni indipendenti dalla risposta cellulare di tipo T e non stimolano di conseguenza la produzione di cellule B della memoria. Per ovviare a questo problema sono stati introdotti di recente in commercio vaccini polisaccaridici coniugati con proteine carrier che si sono dimostrati efficaci nell'indurre un'immunità protettiva. Tuttavia, essi sono costosi e proteggono soltanto verso i sierotipi capsulari inclusi nella preparazione vaccinale. Inoltre, in seguito alla loro somministrazione, si osserva un fenomeno di "serotype replacement" nel nasofaringe dei vaccinati da parte di sierotipi capsulari non inclusi nel vaccino. Negli ultimi anni si è cercato quindi di identificare nuovi antigeni proteici comuni ai vari sierotipi. Tra i candidati più promettenti si sono dimostrate le proteine di superficie *PspA*, *PspC*, *PsaA* e la pneumolisina; inoltre di interesse sembrano essere anche l'autolisina, la neuroamminidasi e la ialuronidasi. La disponibilità di due genomi completi di *S. pneumoniae* ha reso accessibile una quantità enorme di informazioni utili per identificare nuovi fattori di virulenza. Mediante la tecnica di "phage display" è stata costruita una libreria genomica espressa sul capsido del batteriofago lambda. Sono stati identificati vari cloni fagici ricombinanti che esprimono diverse proteine pneumococciche, alcune delle quali note, ed alcune regioni antigeniche di una proteina sconosciuta, codificata dalla ORF spr0075 nel genoma completo del ceppo R6, in corso di caratterizzazione biologica e funzionale.

## ATTIVITÀ ANTIMICROBICA E ANTIVIRALE DIFFERENZIALE DI UN MIMOTOPO KILLER SINTETICO

L. Polonelli, W. Magliani., S.Conti.

Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Università degli Studi di Parma

Un decapeptide killer sintetico (KP) è stato ingegnerizzato dalla sequenza delle regioni variabili di un anticorpo antiidiotipico ricombinante immagine interna di una tossina di lievito caratterizzata dall'ampio spettro di attività antimicrobica nei confronti di microrganismi patogeni per interazione con uno specifico recettore parietale costituito essenzialmente da  $\beta$ -glucani. KP ha mostrato sperimentalmente di esplicare una potente attività microbica *in vitro* neutralizzabile con laminarina ( $\beta$ -1-3 glucano) ma non con pustulano ( $\beta$ -1-6 glucano) e/o una efficace azione terapeutica *in vivo* nei confronti di *Candida albicans* e non-*albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Pneumocystis carinii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leishmania major*, *L. infantum*, *Acanthamoeba castellanii*, inclusi ceppi resistenti ai farmaci convenzionali.

Significativamente, KP ha mostrato di interagire selettivamente con cellule dendritiche murine modulando le loro molteplici funzioni per implementare la risposta immune antimicrobica.

Sorprendentemente, KP ha mostrato omologia di sequenza con segmenti critici delle anse V1/V2 e V3 di gp160 di HIV-1. Conseguentemente, KP ha mostrato di inibire la replicazione endogena del virus in cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) di un paziente in acuta fase di infezione. KP, che non ha mostrato alcun effetto tossico nei confronti di PBMC, ha mostrato di esplicare, nelle stesse condizioni sperimentali, un'azione antiretrovirale molto più potente di AZT. Come evidenziato in linee cellulari di astroglioma transfettate con CD4-CCR5 o CD4-CXCR4 e mediante infezione esogena di PBMC con ceppi linfocitotropi e monocitotropi di HIV-1, il meccanismo d'azione di KP sembra riferibile all'internalizzazione del co-recettore CCR5 e/o al blocco dell'interazione tra recettori e gp120.

Sulla base della significativa omologia di sequenza con parte della regione variabile di un anticorpo neutralizzante l'attività fusogena della emoagglutinina (HA) del virus influenzale, KP ha mostrato, inoltre, di esercitare un blocco completo della replicazione virale dovuto ad una significativa riduzione delle molecole di HA espresse sulla membrana di cellule infette e della loro glicosilazione. Coerentemente, KP ha mostrato di esercitare una significativa attività terapeutica in modelli sperimentali di infezione con un ceppo neurovirulento.

Nel complesso, i nostri risultati mostrano che KP è il primo mimotopo killer con potenziale attività terapeutica nei confronti di agenti patogeni microbici e virali mediata da differenti meccanismi d'azione.

## IL RUOLO DEL LABORATORIO NELLA DIAGNOSI E TIPIZZAZIONE DEL PAPILOMAVIRUS (HPV)

A.Giannattasio, R. Smeraglia

Virologia - Ospedale "Cardinale Ascalesi" - Asl Napoli 1

Direttore: Prof. Riccardo Smeraglia

Il cancro della cervice è la seconda forma di neoplasia più diffusa nella donna. Studi epidemiologici evidenziano come l'infezione da HPV sia il più importante fattore eziologico nello sviluppo del carcinoma.

Lo studio di HPV, limitato dall'impossibilità di coltivazione *in vitro*, è oggi reso possibile da tecniche di biologia molecolare che hanno migliorato le conoscenze della biologia di questo virus e la sua importanza in patologia umana. E' stato, infatti, possibile caratterizzare l'intero genoma di HPV: alcuni geni codificano per proteine non strutturali (E1 E2 E4 E5 E6 E7) altri per proteine virioniche (L1 e L2).

L'intervallo di tempo tra infezione e comparsa del carcinoma può essere lungo e nel caso del carcinoma del tratto genitale maschile può arrivare a decenni.

Non tutti i soggetti con infezione da HPV ad elevato rischio oncogeno sviluppano il tumore ed è ipotizzabile che siano necessari eventi addizionali.

L'amplificazione diretta da campione è il metodo più veloce ed efficace per una diagnosi corretta che consenta di eseguire gli accertamenti diagnostici su soggetti a rischio. E' oggi possibile identificare da un campione, che può essere sia una biopsia che un semplice pap-test, non solo la presenza del virus ma la sua appartenenza ai vari tipi (es. HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 54, 56, 58, o altri tipi più rari come il genotipo 82, recentemente riscontrato nel nostro laboratorio in un'una lesione precancerosa della cervice).

La tecnica della PCR, correlata a tecniche avanzate di rivelazione (ibridazione inversa su piastra, mediante microchips e su striscia di nylon, metodologia NASBA), permette di dimostrare nel campione in esame la presenza del DNA genomico, la presenza dei geni E6 ed E7, la tipizzazione dei genotipi ad alto rischio oncogenico, la presenza dell'RNA messaggero dei geni E6 ed E7 dei genotipi 16, 18, 31, 33, 35, 45, di HPV e lo studio del polimorfismo della proteina p53, oncosoppressore cellulare inibito nel meccanismo di oncogenesi virale.

L'avanzare delle tecniche molecolari per la diagnosi di HPV sarà un validissimo strumento da affiancare al Paptest per la terapia e la prevenzione del cancro alla cervice.

## RELAZIONE TRA PROFILI GENOMICI, VIRULENZA E RESISTENZA IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

Stefani Stefania.

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

In versatilità di strategie patogene, numero di fattori di virulenza e capacità di sopravvivere e moltiplicarsi in svariati ambienti, *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA) risulta essere il primo fra i patogeni umani. Gli MRSA hanno subito una forte spinta evolutiva, mediata dalla pressione selettiva causata dall'uso di un numero sempre maggiore di agenti antimicrobici. Per tale motivo, oggi, si può parlare di MRSA in termini di specie, in quanto essi hanno raggiunto una loro "individualità" nell'ambito di *S. aureus*. Sebbene presentino una struttura di popolazione principalmente clonale, evidenze recenti hanno fatto ipotizzare che la loro fitness elevata possa derivare dal background genetico di cloni virulenti di MSSA nei quali si è inserito *mecA* a livello cromosomico, che si sono evoluti nei diversi cloni maggiormente adattatisi nel tempo. Il locus *mec* presenta quello che viene definito "mec complex", dove *mecA* risulta parte di un elemento genetico mobile chiamato Staphylococcal Chromosomal Cassette (SCC*mec*). A tale aspetto, di recente, è stato introdotto un nuovo approccio volto alla valutazione della biologia di *S. aureus*, mediante analisi delle varianti genotipiche del locus *agr* "accessori- gene-regulator". Quest'ultimo è strutturalmente un cluster di geni regolati da due diversi promotori P<sub>2</sub> e P<sub>3</sub>, di cui il primo regola un sistema di regolazione globale di tipo Quorum-Sensing, mentre il secondo controlla la produzione di una molecola di RNA detta RNIII, che rappresenta l'effettore di tale sistema. *agr*-locus è, quindi, coinvolto nella regolazione dell'espressione di numerosi fattori di virulenza, fra cui esotossine (*hla*, *hld*) e fattori di adesione (*icaA*, *fnbA*). Inoltre, tale locus, mediante la produzione di quattro diverse molecole autoinduttrici (AIPs) esercita un meccanismo di interferenza microbica capace di modulare la capacità di un ceppo di colonizzare i diversi siti di infezione per competizione con la flora microbica residente. Numerose evidenze supportate da diversi dati di laboratorio ipotizzano una correlazione tra background genetico, appartenenza ad uno specifico genotipo *agr* e capacità di acquisire determinanti di resistenza.

## EVOLUZIONE DELLA RESISTENZA DEGLI ENTEROBATTERI AI BETA-LATTAMICI: SECONDA SORVEGLIANZA NAZIONALE

Antonio Toniolo e Francesco Luzzaro

Laboratorio di Microbiologia Medica, Università dell'Insubria e Ospedale di Circolo, Varese

Le beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) sono importanti fattori di resistenza per gli enterobatteri che causano infezioni in ospedale. Da tempo si teme che ceppi produttori di questi enzimi possano diffondersi nella comunità. Per valutare la diffusione di infezioni da enterobatteri ESBL-positivi, abbiamo effettuato nel 2003 uno studio che ha coinvolto 11 laboratori italiani di Microbiologia Clinica. Sono stati studiati 8.681 isolati consecutivi e nonreplicati (6.609 da pazienti ospedalizzati e 2.072 da pazienti ambulatoriali). I ceppi ESBL-positivi sono stati identificati presuntivamente mediante analisi dei dati di MIC ai beta-lattamici e mediante test di sinergia. Nei ceppi sospetti si è poi valutata la presenza di determinanti ESBL mediante ibridazione su colonia, amplificazione genica e sequenziamento diretto del DNA. Di ogni determinante sono stati identificati la classe e il tipo. I risultati del 2003 sono stati paragonati a quelli della nostra precedente indagine nazionale del 1999 nella quale si erano studiati 8.015 isolati batterici.

La prevalenza di enterobatteri ESBL-positivi è risultata del 7,4% tra i pazienti ospedalizzati (6,3% nel 1999) e del 3,5% tra i pazienti ambulatoriali. *E. coli* è risultata la specie più rappresentata tra i pazienti ospedalizzati (*K. pneumoniae* nel 1999). *P. mirabilis* quella più rappresentata tra i pazienti ambulatoriali. In ambedue i gruppi, la maggior parte dei ceppi ESBL-positivi sono stati isolati da casi di infezione urinaria. Gli enzimi più frequenti sono risultati TEM-92 e SHV-12. Alcuni enzimi che non erano stati riscontrati nel 1999 sono emersi recentemente e rappresentano circa un terzo delle ESBL prodotte da enterobatteri di interesse clinico: enzimi del tipo CTX-M in *E. coli* e in *K. pneumoniae*, enzima PER-1 in *Providencia* spp. e in *P. mirabilis*.

I carbapenemici restano attivi contro quasi tutti gli isolati ESBL-positivi, ad eccezione di alcuni ceppi di *P. mirabilis*. Tutti i ceppi ESBL-positivi sono caratterizzati da multiresistenza. Le percentuali di sensibilità ai farmaci sono risultate: 84% piperacillina-tazobactam, 65% amoxicillina-clavulanato, 44% ampicillina-sulbactam, 82% amikacina, 42% gentamicina, 31% ciprofloxacina. I ceppi CTX-M-positivi sono risultati più sensibili all'amikacina (96%) e alla piperacillina-tazobactam (94%) rispetto a quelli TEM- o SHV-positivi.

Le opzioni terapeutiche per gli enterobatteri ESBL-positivi restano tuttora limitate. I carbapenemici, l'amikacina e la piperacillina-tazobactam risultano i farmaci più efficaci. Il fatto che gli enterobatteri ESBL-positivi siano presenti nella comunità indica che anche i medici di famiglia debbano imparare a confrontarsi con questi patogeni emergenti.

## DETOSSIFICAZIONE MICROBICA DI AMBIENTI CONTAMINATI DA METALLOIDI: RIDUZIONE DEL SELENIO E DEL TELLURIO.

Davide Zannoni

Dipartimento di Biologia (DiBES), Università degli Studi di Bologna, Via Irnerio 42, 40126 Bologna (I) e-mail: [davide.zannoni@unibo.it](mailto:davide.zannoni@unibo.it)

L'inquinamento crescente di ampie aree del pianeta e la pressione selettiva indotta da discariche industriali e minerarie ha generato un'ampia varietà di batteri resistenti ai metalli pesanti (Turner, 2001, Recent Res. Dev. Microbiol. 45:69-77). I batteri hanno sviluppato varie strategie per contrastare la tossicità dei metalli e dei metalloidi, come ad esempio: la riduzione del metallo in una forma meno tossica o inerte, adsorbimento, uptake/estrusione, uptake/riduzione, aumento nella espressione dei sistemi di riparazione dei danni cellulari. In generale, la cellula viene danneggiata dai metalli pesanti per mezzo di tre meccanismi: A. la reazione di Fenton, che genera delle forme reattive dell'ossigeno (ROS); B. l'ossidazione, da parte di ossianioni metallici di gruppi tiolici liberi; C. la sostituzione di ioni metallici in proteine redox o chelanti. Tellurio (Te) e selenio (Se) sono due metalloidi chimicamente simili ma molto diversi dal punto di vista biologico: il Se è richiesto in tracce come componente essenziale del metabolismo mentre il Te sembra (al momento) non avere nessun ruolo biologico. Il Te, nella forma di ossianione tellurito ( $\text{TeO}_3^{2-}$ ), è estremamente tossico nei mammiferi e nei batteri (*E. coli* è inibito a 0.5-1 microgr/ml) e la risposta batterica al tellurito si manifesta con evidente "annerimento" delle colonie su agar o delle cellule in sospensione, per la presenza di Te(0) citosolico. È interessante rilevare come in *Pseudomonas* KF707 e *Rhodobacter capsulatus* l'uptake di  $\text{TeO}_3^{2-}$  non sia correlabile alla Te-resistenza (Di Tomaso et al., 2002, Microbiology 148:1699-1708; Borsetti et al. 2003, Protoplasma 221:153-161). *Rb. capsulatus* e *Pseudomonas* KF707 accumulano tellurito riducendolo a Te(0) inerte mentre la detossificazione del selenio, nella forma di selenito ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ), in *Rsp. rubrum* avviene con riduzione citosolica e successiva espulsione di granuli di Se(0) elementare.

Questi dati dimostrano la capacità di molte specie batteriche largamente presenti in ambiente di ricoprire un ruolo fondamentale nel controllo della tossicità di alcuni metalloidi fortemente idrosolubili.

*Ringraziamenti.* Si ringraziano i ricercatori, gli assegnisti, i borsisti e i dottorandi del gruppo di ricerca di Microbiologia Generale del DiBES (Dott.ri R.Borghese, F.Borsetti, M.Carnevali, G.DiTomaso, S.Fedi, V.Tremaroli) che hanno contribuito ad ottenere i dati presentati. Si ringrazia inoltre il MIUR per i finanziamenti PRIN 2001 e 2003.

## VALUTAZIONE DELLA CORRELAZIONE TRA PRESENZA DI HPV ED ESPRESSIONE DELLA p16<sup>INK4A</sup> IN LESIONI VULVARI E CERVICALI MEDIANTE FISH COMBINATA AD IHC CON RIVELAZIONE CHEMILUMINESCENTE

Ambretti S.<sup>1</sup>, Venturoli S.<sup>1</sup>, Mirasoli M.<sup>2</sup>, Cricca M.<sup>1</sup>, Bonvicini F.<sup>1</sup>, Santini D.<sup>3</sup>, Zerbini M.<sup>1</sup>, Musiani M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>D.M.C.S.S. Sez. di Microbiologia, Università di Bologna, <sup>2</sup>Dip. di Scienze Farmaceutiche, Università di Bologna, <sup>3</sup>D.C.S.R.I. Sez. di Anatomia Patologica, Osp. S.Orsola-Malpighi, Via Massarenti 9, 40138 Bologna

Numerosi studi hanno evidenziato come in neoplasie della cervice uterina e di altri distretti, correlate all'infezione da papillomavirus umani (HPV), l'espressione della p16<sup>INK4A</sup>, una proteina coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare, risulti aumentata.

Allo scopo di valutare l'associazione tra positività all'HPV e sovraespressione della p16<sup>INK4A</sup>, abbiamo messo a punto un saggio di ibridazione in situ con rivelazione fluorescente (FISH) per la ricerca del DNA di HPV, combinato ad una tecnica di immunostochimica (IHC) con rivelazione chemiluminescente per l'analisi dell'espressione della p16<sup>INK4A</sup>. Le due metodiche, sensibili e specifiche, sono state applicate sequenzialmente sullo stesso vetrino per consentire una correlazione dei due segnali a livello cellulare.

Il saggio è stato applicato all'analisi di 132 campioni istologici di lesioni vulvari (51) e cervicali (81) di diverso grado.

Per le lesioni della vulva, i nostri risultati indicano come la p16<sup>INK4A</sup> sia sovraespressa nel 95.0% delle neoplasie intraepiteliali vulvari (VIN) e dei carcinomi HPV-positivi, mentre nelle lesioni neoplastiche e preneoplastiche non associate all'infezione da HPV la sovraespressione si evidenzia in una bassa percentuale (26.7%). Le lesioni vulvari benigne, indipendentemente dalla presenza del DNA di HPV (positività del 33.3%), non mostrano un'aumentata espressione della p16<sup>INK4A</sup>.

L'analisi dei campioni cervicali ha evidenziato un aumento delle percentuali di positività sia per l'HPV, sia per la p16<sup>INK4A</sup>, passando dalle lesioni benigne (rispettivamente 50.0 e 9.1%), alle neoplasie intraepiteliali cervicali di basso grado (CIN1, 70.6 e 76.5%), a quelle di alto grado (CIN2-3, 96.3 e 96.0%). Combinando FISH e IHC, risulta come il 97.6% delle lesioni neoplastiche (CIN di ogni grado) siano positive ad almeno una delle due analisi. La metodica combinata dimostra quindi un elevato valore predittivo negativo, dato che una doppia negatività esclude in modo quasi assoluto la presenza di una neoplasia. Nel complesso, la sovraespressione della p16<sup>INK4A</sup> risulta avere una specificità maggiore, rispetto alla positività al DNA di HPV, nel riconoscimento delle lesioni premaligne e maligne HPV-correlate e si propone quindi come potenziale marker di trasformazione neoplastica.

## CARATTERIZZAZIONE BIOCHIMICA E LOCALIZZAZIONE PARIETALE DI UNA $\beta$ 1-3 GLUCANASI IN *CANDIDA ALBICANS*.

Angiolella<sup>1</sup> L., A. Vitali<sup>2</sup>, M.A. Bonito<sup>1</sup>, B. Maras<sup>3</sup>, A. Stringaro<sup>4</sup>, M. Colone<sup>4</sup>, A. Cassone<sup>5</sup>, A.T. Palamara<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica "Sanarelli" Univ. "La Sapienza" Roma.

<sup>2</sup> Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina, Università Cattolica e/o Istituto per la Chimica del Riconoscimento Molecolare, C.N.R."

<sup>3</sup> Dipartimento di Biologia Molecolare, Univ. "La Sapienza" Roma.

<sup>4</sup> Dipartimento di Tecnologia e salute. <sup>5</sup> Dipartimento MIPI .Istituto Superiore di Sanità. Roma.

La parete cellulare di *Candida albicans* è un complesso organello composto principalmente di polisaccaridi, proteine e glicoproteine che costituiscono un fitto intreccio tridimensionale. È stato dimostrato che le principali proteine associate al glucano (GAP) identificate nella parete cellulare di *C. albicans* sono l' enolasi con P.M. di 46 kDa, la fruttosio aldolasi con P.M. di 40 kDa ed una fosfogliceromutasi con P.M. di 29 kDa, tutti enzimi che intervengono nel processo della glicolisi e risiedono nella parete cellulare insieme ad una glicoproteina con peso molecolare di 34 kDa identificata come una  $\beta$  1-3 glucanasi, un enzima coinvolto nell'idrolisi del  $\beta$ -glucano. È stato dimostrato che cellule lievito di *C. albicans*, trattate con diversi farmaci antimicotici presentano un significativo aumento nella parete cellulare di questa glicoproteina<sup>1,2</sup>.

Al fine di individuare il significato funzionale di questa glicoproteina nella risposta ai farmaci antimicotici e studiare i meccanismi coinvolti nella sua modulazione, abbiamo isolato la  $\beta$ 1-3 glucanasi per valutare sia la sua attività biochimica ed immunogena che la sua localizzazione nella parete cellulare in *Candida albicans*.

Studi eseguiti sull'attività biochimica in seguito a purificazione su diverse colonne cromatografiche, hanno messo in evidenza una proteina con una spiccata attività enzimatica verso diversi substrati come la laminarina e pNPG. Inoltre per la sua elevata purificazione è stato prodotto un siero policlonale con un'elevata attività immunogena. Osservazioni al microscopio elettronico di immunomarcature con anticorpi anti  $\beta$  1-3 glucanasi su sezioni ultrasottili del ceppo sensibile di *Candida albicans*, in seguito al trattamento con farmaci hanno rilevato la presenza di numerosi epitopi reattivi sullo strato più esterno della parete cellulare del lievito. I dati ottenuti dimostrano il ruolo di questa glicoproteina nel riarrangiamento della parete cellulare del fungo. La sua localizzazione esterna ed il suo ruolo altamente immunogeno suggeriscono un potenziale utilizzo della glicoproteina come attivatore della risposta immune contro *Candida albicans*.

## LA RIMOZIONE SELETTIVA DI ANIONI SUPEROSSIDO È CRUCIALE PER LA REPLICAZIONE DI HIV-1 IN MACROFAGI PRIMARI UMANI E PREVIENE L'APOPTOSI MEDIATA DA PEROSSINITRITI IN CELLULE NEURONALI.

Aquaro S.<sup>1</sup>, Pollicita M.<sup>1</sup>, Muscoli C.<sup>2</sup>, Ranazzi A.<sup>1</sup>, Granato T.<sup>2</sup>, Bellocchi MC.<sup>1</sup>, Modesti A.<sup>1</sup>, Mollace V.<sup>2</sup>, Caliò R.<sup>1</sup>, Perno CF.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Università di Tor Vergata Roma; <sup>2</sup>Facoltà di Farmacia, Università Magna Grecia, Catanzaro.

L'infezione di HIV-1 induce in macrofagi (M/M) una perturbazione dello stato ossidativo con aumento della produzione di anioni superossido durante la replicazione virale. Scopo del lavoro è stato valutare il ruolo della produzione di superossido nella replicazione di HIV-1 in M/M e nell'apoptosi neuronale ad essa correlata. Il ruolo degli ioni superossido nella replicazione di HIV-1 in M/M è valutato mediante determinazione con malondialdeide (MDA). La produzione virale è rivelata tramite p24 ELISA, western blot, e microscopia elettronica durante trattamento con M40401, composto non-peptidico mimetico dell'enzima superossido dismutasi. L'espressione genica è analizzata in M/M infettati da HIV-1 mediante microarray. L'apoptosi in due linee neuronali umane (SK-N-SH and CHP-100) è valutata tramite analisi al FACS. L'overproduzione di MDA in M/M infettati da HIV-1 è ridotta in presenza di M40401. L'analisi di microarray rivela che SOD and SOD1 sono entrambi down-regolati da HIV-1 nei M/M infettati da HIV-1. La maturazione di p55 e p24 è drasticamente inibita da M40401 sia in M/M acutamente che cronicamente infettati. A conferma di tali risultati la microscopia elettronica rivela che M40401 in M/M infettati da HIV-1 riduce drasticamente la produzione di particelle virali. Pertanto l'infettività di HIV-1 in presenza del farmaco è ridotta di oltre un logaritmo rispetto al controllo. In presenza di M40401 si osserva un'inibizione della replicazione virale in M/M acutamente e cronicamente infettati pari al 99% e al 90% rispetto al controllo. Inoltre il trattamento con M40401 di SK-N-SH e CHP-100 incubate con supernatanti di M/M infettati da HIV-1 inibisce fortemente l'apoptosi correlata alla formazione di anioni superossido. I risultati evidenziano il ruolo cruciale degli anioni superossido nella replicazione di HIV-1 in M/M e nella neurodegenerazione ad essa correlata, suggerendo l'utilizzo di composti come M40401, in combinazione con antiretrovirali di corrente uso clinico, come nuovi farmaci in grado di bloccare la replicazione di HIV-1 e la patogenesi dell'infezione nel sistema nervoso centrale.

## MULTIPLEX-NESTED RT-PCR PER LA VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEI GENI LITICI E DI LATENZA DI EBV.

Massimiliano Bergallo, Chiara Merlino, Cristina Costa, Sara Baro, Alessandro Negro Ponzi, Rossana Cavallo  
Dip. Di Sanità Pubblica e Microbiologia, S.C.D.U Virologia, Università di Torino

**Introduzione:** Il virus di Epstein-Barr (EBV) appartiene alla famiglia delle herpesviridae, è in grado di determinare infezioni litiche in cellule epiteliali ed infezioni latenti e trasformanti in linee cellulari linfoidi. La riattivazione dell'infezione è frequente nei soggetti trapiantati ed esiste una stretta correlazione tra infezione da EBV, grado di immunosoppressione e sviluppo di disordini linfoproliferativi post-trapianto (PTLD). La disponibilità di strumenti in grado di discriminare tra infezione latente e riattivata è utile nella valutazione dei pazienti trapiantati. La PCR quantitativa consente la determinazione della carica virale sia sui PBMC che su siero, tuttavia mancano standard internazionali e un cut-off predittivo reale per identificare i pazienti a rischio di PTLD.

**Razionale:** Lo scopo di questo lavoro è la messa a punto di due multiplex-nested RT-PCR per valutare la presenza dei trascritti dei geni latenti (BKRF1, BYRF1, BNLF1 e LMP2) e litici (BZLF1, BALF2 e BcLF1) di EBV nei PBMC.

**Materiali e metodi:** La metodica è stata messa a punto su cellule Raji (ATCC CCL-86) indotte con TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor beta 1) e PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) per attivare il ciclo litico e su 3 gruppi di controllo: (I) soggetti pediatrici immunocompetenti con infezione primaria, (II) pregressa, (III) sieronegativi; e applicata ad un gruppo di adulti trapiantati renali asintomatici nel quale il profilo di espressione genica è stato confrontato con la carica di EBV-DNA ottenuta mediante PCR quantitativa.

**Risultati:** I risultati confermano che, in corso di infezione primaria, nei PBMC sono rilevabili i trascritti litici di EBV: BALF2 (77,8%), BcLF1 (70,4%) e BZLF1 (33,3%). L' 11,1% dei pazienti presenta LMP2, il 18,5% LMP1, EBNA1 e EBNA2 sono assenti. Nel gruppo III non sono riscontrabili trascritti litici e latenti, mentre nel gruppo II sono identificabili: LMP2 (60%), EBNA1 (53,5%), LMP1 e EBNA2 sono assenti. Nei soggetti trapiantati, 7 pazienti hanno una carica di EBV-DNA di 1000 copie/10<sup>5</sup> PBMC e 1/7 di 5000 copie /10<sup>5</sup> PBMC. Il 66,6% è positivo per LMP2 e il 20% per LMP1, tutti sono negativi per EBNA1 e EBNA2. Il 96,7% è negativo per i trascritti litici, mentre il 33,3% è positivo per BcLF1. Non si riscontra una significativa correlazione tra l'espressione di geni latenti e litici e la carica di EBV-DNA.

**Conclusioni:** In conclusione, le due multiplex-nested RT-PCR consentono di valutare l'attività trascrizionale di EBV e possono essere affiancate al monitoraggio della carica virale nei PBMC nei trapiantati renali per definire i fattori predittivi positivi per lo sviluppo di PTLD EBV-correlati.

## REAL-TIME PCR PER LA DIAGNOSI E LA GENOTIPIZZAZIONE DI GIARDIA DUODENALIS IN CAMPIONI FECALI UMANI

Berrilli F.\*<sup>^</sup>, Di Cave D.\*<sup>^</sup>, Valentini A.\*, Iori R.\*, D'Orazi C.\*, Bellincampi L.\*, Bernardini S.\* , Federici G.\*

\*Dip. Medicina di Laboratorio, Policlinico Universitario Tor Vergata, Roma, <sup>^</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica e Biologia Cellulare, Università Tor Vergata, Roma.

Il flagellato intestinale *Giardia duodenalis* è una delle più comuni cause di diarrea di origine non virale o batterica dell'uomo e di specie animali domestiche e selvatiche. L'infezione si realizza soprattutto attraverso l'ingestione di acqua e/o cibo contaminati come pure attraverso il contatto diretto oro-fecale. La diagnosi di laboratorio è eseguita principalmente attraverso l'analisi microscopica di campioni di feci per l'individuazione di cisti o trofozoiti. L'uso di esami microscopici diretti a immunofluorescenza e test ELISA sono inoltre comunemente impiegati quali ulteriori metodi diagnostici. Negli ultimi anni, numerosi saggi sono stati messi a punto per l'identificazione del parassita attraverso tecniche molecolari. Queste metodologie presentano numerosi vantaggi in termini di sensibilità, specificità, rapidità di esecuzione e standardizzazione rispetto alle tecniche convenzionali. Inoltre le informazioni che si possono ottenere, soprattutto sequenze di DNA, sono essenziali per meglio definire l'epidemiologia della malattia, per conoscere la distribuzione dei genotipi e la loro specificità per l'ospite e per attuare opportune misure di controllo. Obiettivo del presente lavoro è stato quello di applicare tecniche di PCR basate su fluorescenza (real-Time PCR) per ottenere un test diagnostico di *Giardia* più rapido, sensibile e specifico rispetto alla microscopia.

139 campioni di feci provenienti da soggetti sia adulti sia in età pediatrica sono stati esaminati microscopicamente e mediante PCR convenzionale. Su tutti i campioni è stata inoltre eseguita una real-Time PCR (LightCycler-Roche) utilizzando sonde (FRET) sintetizzate sul gene 16-rRNA, identificato il genotipo e valutata la concordanza assoluta fra le diverse metodiche (test K). I risultati ottenuti evidenziano bassi valori di concordanza fra la metodica di routine (microscopia) e la real-Time PCR dovuti all'alta percentuale di campioni risultati negativi all'esame microscopico e all'alta sensibilità della real-Time PCR (96%). Il presente studio evidenzia la necessità di metodiche più sensibili nella diagnosi di *Giardia* e conferma l'utilizzo della real-Time PCR quale tecnica indicata per la diagnostica clinica di routine.

## UN NUOVO SAGGIO DI REAL-TIME PCR PER LA RIVELAZIONE RAPIDA DI *P. OVALE* E *P. MALARIAE*.

Calderaro A., Piccolo G., Perandin F.<sup>1</sup>, Ricci L.<sup>2</sup>, Manca N.<sup>1</sup>, Dettori G., Chezzi C.

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma;

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata, Cattedra di Microbiologia, Università degli Studi di Brescia;

<sup>2</sup>Arcispedale di Reggio Emilia.

**Introduzione.** Negli ultimi anni l'utilizzo dei saggi di PCR per la diagnosi di malaria ha evidenziato un aumento della prevalenza in Italia dei casi d'infezione da *P.ovale* (*Po*) e *P.malariae* (*Pm*), sottostimata nel passato mediante esame microscopico. D'altra parte è stata dimostrata la presenza di ceppi di *Po* e *Pm* mutati nel gene 18S-rDNA che potrebbero non essere rivelati dai saggi di PCR basati su questo bersaglio. Qui riportiamo la valutazione di un nuovo saggio di real-time-PCR, descritto in letteratura, per l'identificazione di *Po* e *Pm*, rispettivamente.

**Metodi.** Centosette campioni di sangue di altrettanti pazienti con sospetta malaria sono stati sottoposti ad osservazione microscopica, a real-time-PCR per *Po/Pm* e ai sistemi di riferimento da noi utilizzati per la diagnosi molecolare di malaria: una nested-PCR per *P.falciparum*(*Pf*)/*P.vivax*(*Pv*)/*Po/Pm* e una real-time-PCR per *Pf/Pv/Po*.

**Risultati.** Mediante esame microscopico i campioni erano: 9 positivi per *Pf*, 12 per *Pv*, 7 per *Po*, 3 per *Pm*, 1 per *Pv/Po*, 2 per *Plasmodium* spp. e 73 erano negativi. La nested-PCR e la real-time-PCR di riferimento hanno identificato 20 e 10 *P.ovale*, rispettivamente, mentre la nuova real-time-PCR per *Po* ne ha identificati 16. La nested-PCR di riferimento ha inoltre identificato 8 *Pm*, mentre la nuova real-time-PCR per *Pm* ne ha identificati 6. La nuova real-time-PCR per *Pm/Po* non ha mostrato cross-reattività con il DNA delle altre specie di plasmodi e con quello umano.

**Conclusioni.** I nostri dati suggeriscono che alcune infezioni da *Po* e *Pm* possono essere non diagnosticate mediante esame microscopico e 18S-rDNA-PCRs. La nuova real-time-PCR per *Po/Pm* si è rivelata complessivamente specifica e sensibile ma, nel nostro studio, non in grado di rivelare *Po/Pm* in 4/2 casi, rispettivamente, rispetto alla nested-PCR di riferimento. Non disponiamo quindi al momento, di un saggio di real-time-PCR che possa sostituire la nested-PCR di riferimento, più lunga e indagosa, per la diagnosi di laboratorio di malaria da *P. ovale* e *P. malariae*.

## IN UTERO NAKED GENE TRANSFER AND ANTI-HBV DNA VACCINATION: PROTECTIVE RESPONSE AT BIRTH, SAFETY AND LONG-TERM RESPONSIVENESS

Fazio VM<sup>1,2</sup>, Signori E<sup>1,2</sup>, Rinaldi M<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Università Campus Bio-Medico, C.I.R., Section for Molecular Medicine and BioTechnology, Rome, Italy

<sup>2</sup>Istituto Neurobiologia e Medicina Molecolare, CNR, Rome, Italy

Perinatal infections still carry a high mortality and morbidity. Most of these agents are transmitted peripartum, when several maternal factors and quantitative as well as functional differences between the fetal/neonatal and adult immune-network contribute to reduce immune response. The majority of vertical HBV or HIV transmission occurs at or near the time of birth, and no totally effective protective or therapeutic strategies are yet available.

We present the effects of *in utero* gene transfer by trans-placental naked DNA injection into foetal muscles, in a large mammalian model (swine), which is comparable to human in terms of both foetus size and muscle and immune development. A single injection at two third of gestation (90 days) of a naked plasmid expressing the HBV S antigen induces anti-HBs antibody "protective" levels already at birth. Vaccine injection closer to delivery results in immune ignorance without inducing tolerance. The obtained immune response confers long term immune memory, so that it can be boosted by a single DNA injection years after the primary *in utero* vaccination.

We evaluated short- and long- term safety of the procedure. Two different reporter genes were injected in the foetal thigh muscles at the above-mentioned timing. At 8 days following DNA injection we found high-level of transgenes expression in all injected foetuses. A step gradient of expression from the injected area was observed with both reporter genes and no plasmid expression was detected in other organs. No evidence of local or systemic flogistic alterations or haemorrhage, malformations or mortality was observed. Spontaneous delivery, breastfeeding, normal development and behaviour, no related malformations or pathology up to 2 years following *in-utero* DNA-vaccination in different breeds ensure the long-term safety of the procedure. This demonstration contributes highly valuable data for the development of methods aimed to prevent perinatal infections and may provide new insights for the development of gene therapy strategies directed to different preventive or therapeutic targets. Fazio VM et al. Immune response at birth, long-term immune memory and 2 years follow-up after *in-utero* anti-HBV DNA immunization. **Gene Ther.** 11:544-551, 2004.

Rinaldi M et al. Feasibility of *in utero* DNA vaccination following naked gene transfer into pig fetal muscle: transgene expression, immunity and safety. **Vaccine**, in press 2005.

## PREVALENZA DI CEPPI DI HPV E VARIANTI DI HPV16 NELLE LESIONI GENITALI DELLA POPOLAZIONE ITALIANA.

Tornesello ML, Duraturo ML, Buonaguro L, Franceschi S\*, Buonaguro FM, *Oncogenesi Virale e Centro Regionale Ref AIDS, Ist. Naz. Tumori "Fond. Pascale", Napoli -IT; \*Epidemiology Cancer Unit, WHO, Geneva - CH*

**Introduzione:** Il Papillomavirus tipo 16 (HPV16) presenta diverse varianti (E, AA, As, Af1, Af2), ciascuna con una specifica distribuzione geografica, proprietà biologiche e biochimiche, e rischio di progressione neoplastica (Tornesello *et al.*, 2000; Buonaguro *et al.*, 2000). Recentemente l'identificazione delle varianti di HPV16 nella popolazione femminile generale, e nelle pazienti affette da lesioni invasive (ICC) o da neoplasie intraepiteliali (CIN1-3), afferenti a Centri di screening ginecologico in Lombardia e Campania, ha permesso la caratterizzazione della distribuzione di varianti e la valutazione del rischio di progressione neoplastica presente nella popolazione italiana.

**Metodi:** Campioni biologici da cervice uterina sono stati collezionati da 197 pazienti e da 257 soggetti clinicamente sani (controlli) nello stesso range di età. Le sequenze di HPV16 sono state identificate mediante una reazione di PCR specifica per i geni E6/E7. Inoltre è stato messo a punto ed utilizzato un sistema di PCR per l'identificazione delle classi e sottoclassi di HPV16 basato sull'utilizzo di oligoprimeri specifici per la presenza di nucleotidi *signature* delle rispettive LCR ed E6.

**Risultati:** Sequenze di HPV16 sono state identificate nel 62.8% degli ICC, 43.9% del CIN2-3, 43.4% del CIN1 e nell'8.6% dei controlli. Nelle 123 lesioni positive per l'HPV16 sono state identificate le quattro varianti virali: Ep-T350, E-G350, AA ed Af1 (Buonaguro *et al.*, 2004). Le pazienti infettate da varianti non-Europee (AA ed Af1) presentavano un rischio di sviluppare lesioni ICC (OR = 68.9) più alto di quelle infettate da varianti Europee (Ep-T350 ed E-G350) (OR = 13.0) rispetto a soggetti negativi per l'HPV16. Inoltre i soggetti positivi per varianti non Europee presentavano un rischio relativo (RR) di sviluppare ICC 15.3 superiore a quei soggetti positivi per l'HPV16 Europeo prototipo (Ep-T350) (Tornesello *et al.*, 2004).

**Discussione:** La presenza di varianti non Europee dell'HPV16 nel 21.7% dell'ICC, rare nelle lesioni preinvasive (<9%) e nei tessuti normali di controllo (>0.5%), e la loro associazione ad un maggiore rischio relativo di progressione ad ICC suggerisce che esse sono più oncogeniche delle varianti Europee, con la rilevante implicazione della necessità di identificare le varianti di HPV16 ed ottimizzare i protocolli diagnostico/terapeutici, incluso lo sviluppo di vaccini terapeutici specifici.

## BRUSHING DELLA MUCOSA ORALE PER LA DIAGNOSI DI INFEZIONE DA HPV IN PAZIENTI CON LESIONI ORALI POTENZIALMENTE MALIGNI E MALIGNI

M.P. Caleca.<sup>1</sup>, L. Giovannelli <sup>1</sup>, G. Capra <sup>1</sup>, M.C. Migliore.<sup>1</sup>, G. Campisi.<sup>2</sup>, P. Ammatuna <sup>1</sup>. Dipartimento di Igiene e Microbiologia<sup>1</sup>; Dipartimento di Scienze Stomatologiche<sup>2</sup>; Università degli Studi di Palermo, Palermo.

Un accurato prelievo delle cellule della mucosa orale mediante "brushing" è importante per la diagnosi di infezione da papillomavirus umano (HPV) in pazienti con lesioni potenzialmente maligne (leucoplachia orale, OL; lichen planus orale, OLP) e maligne (carcinoma orale a cellule squamose, OSCC). Questo studio ha valutato una procedura modificata di campionamento mediante brushing, effettuando un prelievo di cellule mucosali sia dal sito della lesione che sul sito sano contrapposto a quello della lesione. I risultati sono stati analizzati anche valutando la presenza di cheratinizzazione nel sito orale sede della lesione.

L'HPV-DNA è stato ricercato in 50 pazienti con OL, 49 con OLP, e 17 con OSCC mediante PCR "nested" con primer MY09/MY11 e GP5+/GP6+ ; i genotipi virali sono stati identificati tramite sequenziamento genomico o ibridazione su strip (INNOLiPA, INNOGENETICS). I dati sono stati analizzati mediante test di Fisher, test  $\chi^2$ , e un modello logit.

L'HPV-DNA è stato riscontrato nei siti con lesione e in quelli sani nel 22% e 16% dei pazienti con OL ( $p=0.22$ ), nel 24.5% e 22.4% ( $p=0.40$ ) con OLP e nel 35.3% e 41.2% ( $p=0.36$ ) con OSCC. La frequenza di riscontro di HPV mediante doppio campionamento è stata simile a quella ottenuta campionando solo il sito della lesione (OL:  $p=0.24$ ; OLP:  $p=0.41$ ; OSCC:  $p=0.24$ ). I siti con lesione contrapposti a siti sani HPV positivi hanno evidenziato una possibilità 30 volte maggiore (95%IC: 9.57-94.1) di essere HPV positivi, rispetto ai siti con lesione contrapposti a siti sani HPV negativi. Una ridotta prevalenza di HPV è stata riscontrata nei siti cheratinizzati (14.5%) paragonati ai siti non cheratinizzati (34%;  $p=0.007$ ; OR=0.32; 95%IC:0.13-0.81). In ordine di frequenza, i genotipi virali identificati sono stati HPV-18, -6, -16, -33 e -53.

Il doppio brushing in pazienti con lesioni orali permette una diagnosi più accurata di infezione da HPV. In caso di lesioni difficili da campionare (per accesso al sito della lesione, visibilità, prelievo doloroso) la presenza di HPV nel sito sano contrapposto ha valore predittivo di infezione da HPV nel sito della lesione. Inoltre, il doppio brushing permette un'analisi più accurata di lesioni orali localizzate in siti cheratinizzati, da cui è più difficile ottenere un numero di cellule superficiali adeguato per l'esecuzione dell'esame.

## PREVALENZA DI INFEZIONE DA HPV IN UN GRUPPO DI DONNE IMMIGRATE A PALERMO: ASSOCIAZIONE CON LESIONI CERVICALI, PROVENIENZA GEOGRAFICA E VARIABILI SOCIO-COMPORTAMENTALI.

G.Capra<sup>a)</sup>, L.Giovanelli<sup>a)</sup>, M.P. Caleca<sup>a)</sup>, M.C. Migliore<sup>a)</sup>, R. Vassallo<sup>b)</sup>, M. Affronti<sup>c)</sup>, P. Ammatuna<sup>a)</sup>

*Dipartimento di Igiene e Microbiologia <sup>a)</sup>, Clinica Ostetrica e Ginecologica <sup>b)</sup>; Dipartimento di Medicina Clinica e delle Patologie Emergenti <sup>c)</sup>; Università degli Studi di Palermo, Palermo.*

Scopo del presente lavoro è stata la valutazione della prevalenza di infezione cervicale da papillomavirus umano (HPV) in 90 donne immigrate, in relazione alla presenza di lesioni intraepiteliali squamose (SIL) cervicali e a variabili socio-demografiche (paese d'origine, età, età al menarca, età al primo rapporto, numero di partners, stato maritale, alimentazione, uso di contraccettivi, parità, istruzione, lavoro). Le informazioni sono state raccolte con la collaborazione di un mediatore culturale. La presenza dell'HPV DNA è stata ricercata mediante test di amplificazione/ibridazione HPV-INNOLiPA (Innogenetics) e amplificazione *nested* con primers MY09/11 e GP05+/06+, quest'ultima seguita da sequenziamento genomico per la genotipizzazione virale. La presenza di SIL è stata diagnosticata mediante esame citologico, colposcopico e istologico. I dati sono stati analizzati in un modello di regressione logistica (logit).

Delle donne in studio (età media: 35.4 anni; range: 23-52), 48 (53.3%) provenivano dall'Africa, 31 (34.4%) dall'Europa Orientale, 6 (6.6%) dall'Asia e 5 (5.5%) dal Sud America. L'infezione da HPV è stata diagnosticata in 37 (41.1%) donne, con prevalenza simile nelle immigrate dall'Europa Orientale (42.0%) e dall'Africa (41.6%), e leggermente inferiore nelle donne provenienti dall'Asia (30.0%) e dal Sud America (32.0%). Sono stati identificati genotipi virali sia ad alto (HPV-16, -18, -31, -35, -39, -51, -53, -56, -58) che a basso rischio (HPV-11, -44, -54, -70, -74, -81). La prevalenza di SIL, tutte di basso grado e tutte positive per HPV, era del 12.5%. Nell'analisi multivariata, le variabili significativamente associate ( $p < 0.05$ ) ad infezione da HPV sono state minore età al menarca, minore età al primo rapporto, elevato numero di partners e stato maritale.

La diagnosi di infezione da HPV, e l'eventuale trattamento delle lesioni riscontrate, è necessaria per la prevenzione della patologia neoplastica cervicale nelle immigrate, specialmente se non ancora inquadrata nei servizi sanitari. Rimane ancora da approfondire l'aspetto epidemiologico dell'infezione da HPV in particolari sottopopolazioni ragionevolmente ipotizzabili a maggior rischio, per la difficoltà di accedere ai servizi sanitari pubblici specializzati.

## LA PROTEINA U94/REP DELL'HERPESVIRUS UMANO DI TIPO 6 (HHV-6) INIBISCE LA REPLICAZIONE DEI BETA-HERPESVIRUS

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

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

L'herpesvirus umano di tipo 6 (HHV-6) è l'unico membro della famiglia degli Herpesvirus umani contenente nel proprio genoma il gene U94/rep, omologo del gene non strutturale rep68/78 dei parvovirus adeno-associati. I dati riportati in letteratura suggeriscono che U94/rep possa essere coinvolto nella latenza virale e nella regolazione dell'espressione genica di HHV-6, tuttavia il ruolo di tale fattore è ancora controverso. Pertanto, allo scopo di studiare le funzioni della proteina U94/REP, abbiamo clonato ed espresso il gene full length U94/rep in un sistema procariotico in *E. coli*. La proteina ricombinante ottenuta è stata purificata tramite cromatografia e identificata mediante SDS-PAGE ed immunoblotting, utilizzando un antisiero di coniglio ottenuto tramite immunizzazione genetica specifica. La proteina purificata ha dimostrato di mantenere le caratteristiche immunologiche del prodotto genico nativo, come evidenziato dalla reattività in test ELISA e Western blot usando sieri provenienti da soggetti HHV-6 positivi. La proteina è inoltre captata e internalizzata dalle cellule umane, nelle quali si accumula a livello nucleare, esplicando una marcata attività inibitoria sulla replicazione di entrambe le varianti di HHV-6 (A e B). L'effetto di U94/REP è dose-dipendente, ed è inibito dalla pre-incubazione con single-stranded DNA (ma non con double stranded DNA), suggerendo che il meccanismo di azione sia legato alla sua capacità di legame al single stranded DNA. U94/REP inibisce inoltre la replicazione degli altri beta-herpesvirus (HHV-7 e CMV), ma non ha effetto sugli alfa-herpesvirus (HSV-1) o sui gamma-herpesvirus (HHV-8).

In conclusione, i risultati confermano il ruolo di U94/REP nei meccanismi implicati nella regolazione della replicazione e della latenza di HHV-6, e suggeriscono una sua implicazione anche nelle interazioni tra beta-herpesvirus umani.

## CARATTERIZZAZIONE DI NUOVE MUTAZIONI DELLA TRASCRITTASI INVERSA DI HIV-1 COINVOLTE NEI MECCANISMI DI FARMACORESISTENZA

F Ceccherini-Silberstein<sup>1</sup>, V Svicher<sup>1</sup>, T Sing<sup>2</sup>, MM Santoro<sup>1</sup>, N Beerenwinkel<sup>2</sup>, A Bertoli<sup>1</sup>, F Forbici<sup>3</sup>, MC Bellocchi<sup>3</sup>, P Narciso<sup>3</sup>, F Gago<sup>4</sup>, A d'Arminio Monforte<sup>5</sup>, A Antinori<sup>3</sup>, CF Perno<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Università di Roma "Tor Vergata"; <sup>2</sup>Max Planck Institute for Informatics, Saarbrücken, Germany; <sup>3</sup>INMI "L. Spallanzani", Roma; <sup>4</sup>University of Alcalá, Spain; <sup>5</sup>Università di Milano

**Introduzione:** Recentemente abbiamo identificato nuove mutazioni della trascrittasi inversa (RT) di HIV-1; lo scopo di questo studio è stato di caratterizzarne il ruolo nello sviluppo di resistenza a farmaci inibitori della RT (NRTI).

**Metodi:** Sono state analizzate 1906 sequenze di HIV-1 RT ottenute dal plasma di 551 pazienti naive e 1355 pazienti trattati con NRTI. L'associazione di mutazioni agli NRTI, e ai valori di viremia/CD4 è stata valutata rispettivamente con il test del chi-quadro ed il median-test. Il coefficiente di correlazione binomiale e la cluster analisi sono stati usati per identificare correlazioni tra mutazioni. Sequenze del database Stanford HIV Drug-Resistance sono state analizzate per valutare l'associazione di mutazioni alla suscettibilità in vitro verso gli NRTI.

**Risultati:** 12 mutazioni (K20R, V35M, T39A, K43E/N/Q, K122E, G196E, E203D/K, H208Y, D218E), associate positivamente al trattamento con NRTI, sono risultate fortemente correlate (in coppia e in clusters) con specifiche mutazioni conferenti resistenza agli NRTI. In particolare, T39A, K43E/Q, K122E, E203K, H208Y sono associate con il cluster di mutazioni conferenti resistenza agli analoghi timidinici (TAM1: M41L+L210W+T215Y). La copresenza di queste mutazioni nel cluster TAM1 è risultata associata ad un aumento di resistenza verso gli analoghi timidinici. Inoltre, la copresenza di K43E e H208Y al momento del fallimento è associata ad un aumento di viremia. La mutazione D218E clusterizza con le TAM2 (D67N+K70R+K219Q) e la sua presenza nel cluster è associata ad un aumento significativo di viremia e di resistenza agli analoghi timidinici.

Al contrario, 2 mutazioni (I50V e R83K), negativamente associate agli NRTI, hanno mostrato correlazioni negative con mutazioni conferenti resistenza e sono associate ad un aumento di suscettibilità a specifici NRTI. In particolare, I50V è antagonista della M184V, mutazione specifica per 3TC, mentre R83K è antagonista del cluster TAM2.

**Conclusioni:** Il pattern di mutazioni che regola la resistenza agli NRTI è più complesso di quanto riconosciuto. Il coinvolgimento positivo o antagonista di nuove mutazioni merita un approfondimento per l'affinamento di strategie terapeutiche in grado di limitare lo sviluppo di ceppi resistenti.

## IL DIFFERENZIAMENTO SWARMING E LA MOTILITÀ SWIMMING DI BACILLUS SUBTILIS SONO REGOLATI DALL'OPERONE DICISTRONICO SWRA

<sup>1</sup>F. Celandroni, <sup>1</sup>E. Ghelardi, <sup>1</sup>S. Salvetti, <sup>1</sup>V. Bulgheri, <sup>2</sup>A. Galizzi, <sup>1</sup>S. Senesi

<sup>1</sup>Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia, Università di Pisa, Pisa

<sup>2</sup>Dipartimento di Genetica e Microbiologia "A. Buzzati-Traverso"

Università degli Studi di Pavia, Pavia

La colonizzazione di un substrato solido richiede cooperazione cellulare, integrazione di segnali esogeni e comunicazione cellula-cellula. Un comportamento cooperativo che permette agli eubatteri flagellati di invadere rapidamente superfici solide nell'ambiente naturale è rappresentato dalla motilità *swarming* che, come la motilità *swimming*, si avvale dei flagelli come organelli propulsori. Nonostante questi due tipi di motilità condividano meccanismi comuni, la motilità *swimming* consente alle singole cellule di spostarsi individualmente in mezzo liquido, mentre la motilità *swarming* è il risultato di un profondo differenziamento cellulare durante il quale cellule corte ed oligoflagellate (cellule *swimm*), in risposta al contatto con superfici solide e ricche di nutrienti, danno origine a lunghi elementi cellulari altamente specializzati (cellule *swarm*), dotati di un grande numero di flagelli e capaci di spostarsi coordinatamente sulla superficie di crescita dando luogo ad una migrazione collettiva. Il differenziamento *swarming*, attualmente studiato in diverse specie batteriche, è il risultato dell'alterata espressione di numerosi geni implicati in molte funzioni cellulari tra cui quelli coinvolti nella sintesi dei flagelli e nella divisione cellulare; fino ad oggi, però, non sono stati identificati geni *swarming*-specifici.

Nel presente studio viene descritta, in *Bacillus subtilis*, l'identificazione e caratterizzazione di un operone dicistronico (*swrA*) la cui integrità è necessaria affinché questo microrganismo possa dare origine a cellule *swarm* quando posto su un substrato solido di crescita. L'analisi funzionale dell'operone *swrA* ha permesso di stabilire che: i) *swrAA*, il primo gene dell'operone, agisce, come regolatore del numero di flagelli prodotti in mezzo liquido e la sua funzionalità è necessaria affinché *B. subtilis* possa produrre flagelli quando posto su un substrato solido; ii) *swrAB*, il secondo gene dell'operone, è essenziale affinché *B. subtilis* possa andare incontro al differenziamento *swarming*; iii) il prodotto di *swrAB* è una proteina di membrana dotata di un dominio PDZ probabilmente coinvolto in interazioni proteina-proteina all'interfaccia della membrana cellulare e iv) SwrAB è in grado di processare SwrAA inducendo, con meccanismi molecolari ancora da chiarire, le profonde modificazioni cui si assiste durante il differenziamento *swarming*.

## STATO REDOX E REPLICAZIONE VIRALE

1A.T. Palamara, 1L. Nencioni, 2 R. Sgarbanti, 2G. De Chiara, 2M.E. Marcocci, 2E. Garaci

<sup>1</sup>Dip. Scienze Sanità Pubblica, Università di Roma "La Sapienza", <sup>2</sup>Dip. Medicina Sperimentale, Università di Roma "Tor Vergata"

Fisiologicamente l'ambiente ossido-riduttivo intracellulare è mantenuto in condizioni riducenti grazie a diverse molecole con funzioni specifiche, tra cui il glutatione ridotto (GSH), la superossido-dismutasi, la tioredoxina e diversi enzimi. Numerose evidenze sperimentali e cliniche hanno recentemente dimostrato che nel corso di infezioni virali si verificano alterazioni dell'equilibrio redox in senso pro-ossidante che variano in intensità, durata e meccanismo di induzione a seconda del virus implicato e del tipo cellulare nel quale si instaura l'infezione.

Lo stato pro-ossidante può essere dovuto a diversi fattori, dalla deplezione di GSH alla iper-produzione di radicali liberi dell'ossigeno o dell'azoto ma, in ogni caso, esso svolge un ruolo regolatorio in molteplici eventi della replicazione virale e della risposta cellulare all'infezione. È noto, ad esempio, che molecole recettoriali, vie di segnalazione cellulare (MAP chinasi ecc), fattori di trascrizione (NF-κB, STAT ecc.), rispondono a variazioni temporanee anche modeste dello stato redox. Uno stato intracellulare ossidato favorisce la replicazione virale anche facilitando la formazione di ponti disolfuro nelle glicoproteine virali, step essenziale per la loro oligomerizzazione, folding ed inserimento nella membrana cellulare. Tali risultati hanno dato l'impulso ad una notevole mole di ricerche volte a dimostrare l'efficacia antivirale di sostanze antiossidanti, tra le quali il GSH e suoi analoghi di sintesi hanno dato risultati soddisfacenti in modelli sperimentali *in vitro* ed *in vivo*.

Un ulteriore aspetto del controllo redox sulla replicazione virale, è rappresentato dalla sua importanza nel determinare la suscettibilità cellulare all'infezione. È stato recentemente dimostrato, infatti, che la capacità del virus influenzale di replicare in cellule di diversi distretti dipende dal loro contenuto endogeno in GSH e dall'espressione della proteina antiapoptotica Bcl-2. Entrambe le molecole sono parte integrante del corredo antiossidante della cellula eucariotica.

Gli studi finora effettuati gettano le basi per l'identificazione di nuovi farmaci ad attività antivirale che, modulando funzioni cellulari, siano capaci di interferire con diverse fasi del ciclo replicativo virale e caratterizzate da un'azione antivirale "ad ampio spettro".

## I COXSACKIEVIRUS B POSSONO INDURRE DIABETE ATTRAVERSO L'INFEZIONE DELLE CELLULE ENDOTELIALI DELLE ISOLE DI LANGERHANS DEL PANCREAS

Feroli E, Favaro E\*, Bottelli A, Peakman M\*\*, Camussi G\*, Zanone M\*, Conaldi PG

Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica, Università dell'Insubria, Varese; \*Dipartimento di Medicina Interna, Università di Torino; \*\*Department of Immunology and Diabetes, King's College, London, UK

Il diabete di tipo I è dovuto ad un danno delle cellule β produttrici di insulina, danno per lo più conseguente all'attivazione di processi cronici di natura infiammatoria e immunologica e mediato dal rilascio di citochine e Fas-L nelle isole di Langerhans. I virus (in particolare coxsackievirus B4, CVB4) sono ritenuti possibili cause di diabete, ma i meccanismi patogenetici non sono stati finora chiariti. Le cellule del microendotelio (MEC) svolgono un ruolo chiave nei processi fisiopatologici insulari che portano al diabete. Poiché il nostro gruppo ha dimostrato che i CVB possono infettare in modo persistente le cellule endoteliali con attivazione di processi infiammatori cronici, abbiamo indagato la suscettibilità delle MEC insulari a CVB4 e gli eventuali effetti pro-diabetogeni indotti dall'infezione. A tale fine abbiamo allestito colture primarie di MEC insulari da cui abbiamo sviluppato linee immortalizzate con SV40. Le MEC insulari sono state caratterizzate in base all'espressione di marker specifici (α-1 proteinasi e nefrina) e ne è stato valutato il profilo immunologico. Le prove di infezione hanno dimostrato che CVB4 replica in modo persistente nelle MEC insulari con rilascio di virus infettante (titoli fino a  $10^{-3.3}$  TCID<sub>50</sub>/ml) ma in assenza di un effetto citopatico rilevante. L'espressione di CD55, recettore CVB-specifico, risulta aumentata nel corso dell'infezione persistente. A carico delle MEC insulari infettate sono stati riscontrati effetti pro-infiammatori persistenti in termini sia di iperespressione di molecole di adesione (ICAM e VCAM) sia di produzione di citochine (IL-1β, IL-6, IL-8, linfotattina). È da rilevare che tali mediatori non solo svolgono un ruolo decisivo nella patogenesi immuno-mediata del diabete, ma possono anche danneggiare in modo diretto le cellule β. Nelle fasi iniziali dell'infezione è stato rilevato il rilascio di IL-18, citochina inducente IFN-γ, altro importante mediatore del danno insulare. Dato di particolare interesse è stato il riscontro dell'espressione nelle MEC insulari infettate da CVB4 di Fas-L, fattore decisivo nei processi di apoptosi a carico cellule β. È possibile pertanto concludere che l'infezione delle MEC insulari da parte di CVB4 determina in modo diretto l'attivazione di meccanismi di danno delle cellule β produttrici di insulina.

## ANALISI DEL DNA DI HPV 16 E DEGLI mRNA E6/E7 IN CAMPIONI CITOLOGICI CERVICALI

Cricca M, Venturoli S, Ambretti S, Costa S\*, Gentilomi G, Gallinella G, Musiani M, Zerbini M.

DMCSS, Sez. Microbiologia, Sant'Orsola-Malpighi, Università degli Studi di Bologna

\*Dip. Ostetricia e Ginecologia, Sant'Orsola Malpighi, Bologna

Il DNA di HPV è stato rivelato in più del 90% dei carcinomi cervicali, il genotipo maggiormente rappresentato è risultato l'HPV 16 (>50%). Nella progressione tumorale hanno un ruolo importante sia l'integrazione del genoma virale nel genoma della cellula ospite, sia la sovraespressione di mRNA E6/E7.

In questo studio sono stati analizzati carica virale, stato fisico ed mRNA E6/E7 di HPV 16 in campioni citologici cervicali.

In una prima fase dello studio sono stati allestiti saggi di Real time PCR per la determinazione della carica virale e dello stato fisico di HPV 16, questi saggi sono stati applicati all'analisi di 114 esfoliati cervicali provenienti da pazienti con lesioni cervicali di diverso grado. Il valore medio di carica virale normalizzato per  $10^6$  copie di GAPDH è risultato di  $3,48 \times 10^5$  in lesioni di basso grado (LSIL) e di  $1,29 \times 10^7$  in lesioni di alto grado (HSIL) e carcinomi. Lo stato fisico è stato determinato mediante il rapporto E2/E6, essendo il gene E2 interrotto nel processo di integrazione. Per discriminare tra lo stato puramente episomiale e quello misto (integrato + episomiale) è stato stabilito un valore sperimentale di ratio E2/E6 mediante l'impiego di due cloni che mimano l'uno lo stato episomiale e l'altro lo stato integrato. DNA di HPV 16 allo stato misto/integrato è risultato presente nel 28% delle LSIL e nel 73% delle HSIL/carcinomi.

In una seconda fase dello studio sono stati analizzati 20 campioni citologici cervicali per l'analisi degli mRNA E6/E7 con tecniche di RT-PCR end point ed RT-PCR Real time. I primer impiegati per le reazioni di RT-PCR amplificano le due specie E6I\*, E6II\* grazie all'impiego di un primer senso comune e di due primer antisense intron-spanning.

L'analisi del DNA di HPV 16 ha consentito di stabilire un valore soglia ( $3,48 \times 10^5$ ) per individuare le pazienti a maggior rischio di progressione tumorale, ha messo in evidenza la non rara presenza di DNA allo stato misto in lesioni di basso grado (28%) e valori medi di carica virale, per il DNA allo stato episomiale, maggiori in HSIL rispetto a LSIL ( $1,13 \times 10^7$  vs  $2,68 \times 10^5$ ). Per quanto concerne l'analisi dei messaggeri i dati sono ancora preliminari, comunque è stata osservata una maggior produzione della specie E6\*I rispetto alla E6\*II in lesioni di alto grado e la produzione di messaggeri in pazienti con citologia negativa o ASCUS post-cono.

## IDENTIFICAZIONE DI UNA FAMIGLIA DI GENI PUTATIVAMENTE COINVOLTI NELL'EFFETTO CITOPATICO DI *TRICHOMONAS VAGINALIS*

Daniele Dessì, Nicia Diaz, Paola Rappelli, Pier Luigi Fiori

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

Il protozoo *T. vaginalis* è l'agente causale della tricomoniasi, la malattia non virale a trasmissione sessuale più diffusa al mondo. Il danno tissutale all'ospite umano, oltre ad essere determinato da una massiccia risposta infiammatoria locale, vede tra le sue cause anche l'azione diretta di molecole protozoarie come proteine formanti poro e proteasi. L'effetto citolitico di *T. vaginalis* nei confronti delle cellule dell'ospite, caratteristica condivisa con altri protozoi patogeni per l'uomo come *E. histolytica* e *N. fowleri*, è stato ampiamente caratterizzato in passato ma i geni e le proteine coinvolti non sono mai stati identificati. Il recente completamento della sequenza del genoma di *T. vaginalis* ha consentito di fare luce su molti aspetti della biologia di questo protozoo. In particolare, abbiamo identificato 7 predette ORFs codificanti per putative proteine formanti poro appartenenti alla famiglia delle *saposin-like proteins* (SAPLIP). Le SAPLIP sono proteine con una struttura altamente conservata che possono essere avere le funzioni più diverse:

- Amoebapores and Naegleriapores, proteine formanti poro coinvolte nella lisi delle cellule bersaglio da parte di *E. histolytica* e *N. fowleri*.
- Saposine A-D, cofattori nel catabolismo lipidico.
- Granulisine e NK-lisine, peptidi batteriolitici prodotti dai linfociti T CD8+ e cellule NK.
- Proteina B del surfattante polmonare.

Un tratto funzionale comune in questa eterogenea famiglia di proteine è l'interazione con i lipidi. A livello strutturale e di sequenza, le SAPLIP hanno in comune un motivo polipeptidico di 76 aminoacidi caratterizzato da 6 residui di cisteina in posizioni conservate e un'abbondanza di residui idrofobici. Analisi di sequenza sulle 7 ORF predette di *T. vaginalis* (chiamate TVSaplip1-7) hanno mostrato come TvSaplip1 e 2 siano composti da 6 differenti motivi saplip da 76 aminoacidi e una sequenza segnale all'N-terminale. L'organizzazione è simile a quella delle naegleriapores e delle saposine, dove da un precursore vengono rilasciati i peptidi da 76 aa bioattivi. TvSaplip3, 5, 6 e 7 mostrano tutti un unico motivo saplip, mentre TvSaplip4 mostra un putativo precursore con 4 diversi domini saplip. TvSaplip7 è l'unico che manca di un peptide segnale N-terminale. Esperimenti di RT-PCR hanno dimostrato come tutte le 7 ORF siano espresse dal protozoo, mentre lo screening di una library di cDNA ha portato sino ad ora all'identificazione di 4 cloni con inserti di cDNA corrispondenti a TvSaplip1, 2, 3, 6. Ulteriori esperimenti di caratterizzazioni funzionali saranno necessari per dimostrare infine un effettivo coinvolgimento dei geni TvSaplip nel processo citopatico di *T. vaginalis*.

## ELEVATA PREVALENZA E PERSISTENZA DELL'INFEZIONE DA METAPNEUMOVIRUS UMANO IN PAZIENTI ADULTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO ALLOGENICO DI CELLULE STAMINALI EMPOIETICHE.

<sup>1</sup>M Debiaggi, <sup>2</sup>F Canducci, <sup>3</sup>AA Colombo, <sup>4</sup>M Parea, <sup>4</sup>C Terulla, <sup>3</sup>L Zenone Bragotti, <sup>3</sup>A Algarotti, <sup>2</sup>M Clementi, <sup>1</sup>E Romero  
<sup>1</sup>Dip. S.M.E.C Sez. Microbiologia, Un di Pavia, <sup>2</sup>Lab. Microbiologia Un "Vita-Salute" San. Raffaele, MI, <sup>3</sup>Div Ematologia e  
<sup>4</sup>Lab Microbiologia IRCCS S.Matteo, Pavia

**Introduzione.** Metapneumovirus umano (hMPV) è responsabile di infezioni respiratorie acute (ARTI) diffuse prevalentemente in età pediatrica. Il virus è stato rilevato anche in ARTI in soggetti adulti, anziani e immunocompromessi, ma i dati epidemiologici a tal riguardo sono ad oggi limitati. In questo studio è stata valutata la prevalenza di hMPV in soggetti adulti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (allo-TMO).

**Materiali e Metodi.** Nel periodo da ottobre 2004 a giugno 2005 si sono esaminati 49 campioni di aspirato nasofaringeo (NPA) ottenuti da 12 pazienti allo-TMO indipendentemente dalla presenza di sintomi respiratori. I campioni sono stati prelevati per ogni paziente prima e durante il periodo di condizionamento pre-TMO e a diversi tempi dopo TMO ed esaminati per la presenza di hMPV mediante RT-PCR. Parallelamente sono stati saggiati anche 170 campioni di NPA ottenuti da una popolazione pediatrica e pervenuti al laboratorio per la ricerca routinaria di virus respiratori. I campioni sono stati tipizzati mediante sequenziamento delle regioni amplificate. Per ogni paziente sono stati registrati dati clinici relativi alla presenza di sintomi o segni di infezioni respiratorie.

**Risultati.** Su 12 pazienti allo-TMO esaminati, 9 sono risultati positivi per hMPV mediante RT-PCR in almeno un campione di NPA. Due pazienti risultavano già positivi prima del periodo di condizionamento pre-trapianto. La persistenza virale nei campioni di NPA veniva rilevata da un minimo di 14 ad un massimo di 84 giorni. Di 49 campioni esaminati, 29 (59.2%) sono risultati positivi. La genotipizzazione è stata effettuata su 10 campioni e tutti sono risultati di gruppo A. Dal punto di vista clinico non sono stati evidenziati segni o sintomi respiratori specifici in nessuno di questi pazienti. Nella popolazione pediatrica la prevalenza di hMPV-RNA è risultata del 15.2% e l'infezione sempre associata ad ARTI.

**Conclusioni.** I risultati ottenuti depongono per un'elevata prevalenza e persistenza di infezione asintomatica da hMPV in pazienti allo-TMO, probabilmente correlata allo stato di immunodepressione dovuto alla patologia di base. Questi dati sottolineano l'importanza di ulteriori studi per chiarire il ruolo del sistema immunitario nella patogenesi dell'infezione e della malattia.

## IDENTIFICAZIONE DI CEPPI DI *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* MEDIANTE MLST.

M. A. De Francesco, F. Perandin, F. Gargiulo, R. Negrini, N. Manca  
Cattedra di Microbiologia, Università degli studi di Brescia  
SMEL- U. O. Microbiologia e Virologia, Spedali Civili, Brescia

L'infezione con *Streptococcus agalactiae* è ancora oggi una causa principale di malattie neonatali quali polmonite, setticemia e meningite e di infezioni urinarie nei soggetti adulti. E' generalmente accettato che la colonizzazione batterica del neonato durante il suo passaggio attraverso il canale del parto sia la causa principale della malattia ad esordio precoce che si manifesta nei neonati con meno di sette giorni. Comunque, *Streptococcus agalactiae* è di solito un organismo commensale e può essere isolato sia dal tratto genito-urinario che dal tratto gastro-intestinale in circa il 35% di adulti sani. Allo scopo di stabilire se esistono ceppi diversi nella loro capacità di determinare virulenza, abbiamo effettuato una indagine molecolare basata sulla tipizzazione mediante sequenziamento a locus multiplo (MLST) su ceppi isolati da pazienti sintomatici che da portatori sani.

Il nostro studio ha evidenziato la presenza di 12 sequenze tipo (ST) con diversi profili allelici nella popolazione campione esaminata. La maggior parte dei ceppi isolati (41 %) da persone sintomatiche era associata con 3 maggiori sequenze tipo (ST-17, ST-19 e ST-96), mentre le altre si distribuivano piuttosto uniformemente tra i pazienti asintomatici. I ceppi isolati con ST-17, tranne uno, erano tutti cloni di sierotipo III indicando che questo ST definisce un clone omogeneo già fortemente associato in letteratura con ceppi invasivi responsabili di infezioni neonatali gravi. Nel nostro studio sono stati infatti identificati due ceppi con ST-17 sierotipo III responsabili di sepsi neonatali. Lo studio, quindi, mediante MLST dei ceppi di *Streptococcus agalactiae*, oltre a fornire una importante base epidemiologica sulla distribuzione dei vari ceppi nelle diverse popolazioni, potrebbe far comprendere meglio la patogenicità dei diversi isolati batterici facilitando l'approccio per lo sviluppo di un vaccino in grado di escludere dalla sua composizione eventuali ceppi commensali apatogeni.

## EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DELL'INFEZIONE DA HCV IN UN COMUNE SICILIANO

D Ferraro, V Giordano, M Giglio, C Argentini°, D Genovese°, T Stroffolini°, M Rapicetta°, A Craxi\*, R Di Stefano.

Dip. di Igiene e Microbiologia, \*Dip. Biomedico di Medicina Interna e Specialistica, Università di Palermo, °ISS, Roma

**Razionale:** Lo studio sieroepidemiologico della popolazione di Camporeale, un paese ad economia rurale della provincia di Palermo, ha evidenziato una prevalenza di infezione da HCV del 10.4%, con massima frequenza (34%) nei soggetti di oltre 60 anni (Di Stefano et al, 2002). Si è ipotizzato che Camporeale possa rappresentare una nicchia ecologica in cui il virus è stato largamente diffuso, mediante l'uso di siringhe di vetro, circa tre decenni fa.

**Obiettivi:** Identificare nei soggetti infettati con HCV genotipo 1b i diversi isolati per studiarne l'evoluzione, risalire ad un virus comune ancestrale e datare il tempo in cui è stato introdotto nella popolazione.

**Metodi:** Gli ampliconi relativi alle regioni genomiche NS5b e HVR, ottenuti mediante PCR *home-made*, sono stati sottoposti a sequenziamento diretto. Le sequenze nucleotidiche sono state allineate con Clustal W 1.8. L'analisi filogenetica è stata eseguita con il software MEGA versione 3.0 mediante l'impiego del modello Kimura 2-parameter e l'algoritmo neighbour joining. Sono state analizzate, come controllo, 13 sequenze di HCV 1b da pazienti dell'area metropolitana di Palermo e 15 sequenze di HCV 1b da pazienti di altre provincie siciliane.

**Risultati e conclusioni:** L'albero filogenetico, costruito sulla base del confronto delle sequenze NS5b, mostra che gli isolati di Camporeale sono aggregati in un ramo dell'albero, separato dagli isolati controllo e da isolati di HCV ottenuti da GeneBank. Tale omogeneità conferma che l'infezione è stata introdotta in un arco di tempo relativamente breve in una popolazione precedentemente a bassa prevalenza di HCV. L'albero filogenetico, relativo alla regione HVR1, mostra una minore aggregazione dei ceppi di Camporeale rispetto alle sequenze di controllo e di riferimento, con una distribuzione casuale delle sostituzioni nucleotidiche. Ciò non permette di apprezzare differenze significative che consentano di aggregare gli isolati in funzione di specifiche e riproducibili mutazioni. Tale osservazione va posta in relazione al tempo relativamente lungo trascorso dall'introduzione del virus nella popolazione, che ha consentito nel singolo individuo l'emergenza di una quasispecie virale.

## LA PROTEINA ENV DI HERV-W/MSRV E' ESPRESSA NELLE LESIONI CEREBRALI DI PAZIENTI SM MA NON NEI CONTROLLI SANI

A. Dolei<sup>1</sup>, V. Astone<sup>1</sup>, G. Arru<sup>2</sup>, S. Marconi<sup>3</sup>, L. Lovato<sup>3</sup>, C. Serra<sup>1</sup>, S. Sotgiu<sup>2</sup>, B. Bonetti<sup>3</sup>, G. Mameli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sect. Microbiology, Dept. Biomedical Sciences, <sup>2</sup>Inst. Clinical Neurology, Univ. Sassari; <sup>3</sup>Sect. Neurology, Dept. Neurological Sciences and Vision, Univ. Verona, Italy.

A. Dolei tel: 079/228304

Fax: 079/212345

e-mail: [doleivir@uniss.it](mailto:doleivir@uniss.it)

L'eziopatogenesi della sclerosi multipla (SM) è tuttora sconosciuta ma si ipotizza che sia innescata da fattori ambientali/virologici in soggetti geneticamente predisposti. MSRV è un retrovirus endogeno membro della famiglia HERV-W; ha proprietà gliotossiche, fusogene, superantigeniche ed è in grado di formare virioni completi. La sua presenza, in forma extracellulare nel plasma e nel liquor di pazienti SM è strettamente correlata con la progressione e la remissione della malattia.

Per identificare e quantificare sequenze di RNA virus-specifiche sono stati analizzati tessuti cerebrali autoptici di pazienti SM e controlli (soggetti deceduti senza patologie cerebrali e pazienti affetti da patologie neurologiche: Alzheimer e astrocitoma).

Per identificare le proteine virali, delle sezioni di cervello sono state marcate con un anticorpo monoclonale specifico per la sintetina: anti-HERV-W/MSRV-*env* (6A2B2). Per quantificare l'espressione degli mRNA virus-specifici sono state utilizzate due metodiche diverse: la RT-PCR semiquantitativa per il gene *pol* e la Real Time RT-PCR per il gene *env*.

Tutte le lesioni dei pazienti SM in fase cronica e attiva presentavano numerose cellule immunoreattive per HERV-W/MSRV (circa il 50% del totale delle cellule gliali). Nei cervelli di controllo sani e nei controlli Alzheimer invece, non è stata rilevata nessuna immunoreattività. Tuttavia si è avuta una debole immunoreattività nei controlli cerebrali con lesioni neoplastiche, localizzata soltanto in alcune cellule gliali.

Nelle lesioni dei pazienti SM è stata osservata un aumento della immunoreattività per HERV-W/MSRV correlata all'estensione della demielinizzazione attiva.

A livello di RNA, tutti i campioni analizzati esprimono sia il gene *env* che *pol* di HERV-W/MSRV ma con un numero di copie significativamente più elevato nei pazienti SM rispetto ai controlli normali e patologici.

Lo studio mostra che l'espressione sia dell'mRNA che della proteina *env* è incrementata nei cervelli di individui SM. Il livello di trascrizione di *pol* ed *env* di HERV-W/MSRV è incrementato di circa 1.4 Log nei cervelli di pazienti SM quando la proteina dell'envelope è presente.

## STUDIO FILOGENETICO DI CEPPI DI LATTOBACILLI ISOLATI DA DIVERSI ECOSISTEMI

Giovanna E. Felis<sup>1</sup>, Antonella Deriu<sup>1</sup>, Donatella Bacciu<sup>1</sup>, Silvia Ortu<sup>1</sup>, Guido Leori<sup>2</sup>, Salvatore Rubino<sup>1</sup>, Franco Dellaglio<sup>3</sup>, Leonardo A. Sechi<sup>1</sup>, Giovanni Fadda<sup>4</sup>, Stefania Zanetti<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia Sperimentale e Clinica, Università degli Studi di Sassari

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi", Sassari

<sup>3</sup> Dipartimento Scientifico e Tecnologico, Università degli Studi di Verona

<sup>4</sup> Istituto di Microbiologia, Policlinico "A. Gemelli", Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

I lattobacilli rivestono una notevole importanza dal punto di vista applicativo dal momento che sono i principali attori di molte fermentazioni alimentari e che stanno trovando sempre maggiore impiego come batteri probiotici. Essi appartengono al genere *Lactobacillus*, che è costituito da oltre 90 specie batteriche ed è strettamente correlato ad altri due generi: *Pediococcus* e *Paralactobacillus*.

La struttura filogenetica dei tre generi è stata determinata sulla base dell'analisi comparativa delle sequenze geniche codificanti per l'RNA ribosomiale 16S. All'interno di questo schema tassonomico sono stati quindi collocati circa trenta nuovi isolati provenienti da tre ecosistemi peculiari: il rumine ovino, il latte ovino e l'apparato vaginale umano.

I ceppi sono stati identificati dal punto di vista molecolare mediante sequenziamento di una regione del gene codificante per l'RNA ribosomiale 16S. La valutazione di fingerprinting genomici ha permesso l'ulteriore caratterizzazione dei ceppi mentre il profilo biochimico, inaffidabile per l'identificazione, è stato necessario per evidenziare eterogeneità anche molto marcate all'interno di una stessa specie.

I risultati ottenuti sono rilevanti sia dal punto di vista metodologico, in quanto è stata evidenziata la necessità di un approccio "polifasico" all'identificazione dei lattobacilli, sia dal punto di vista dei diversi ecosistemi analizzati: il presente studio rappresenta la prima documentazione della presenza di alcune specie di lattobacilli negli habitat considerati.

## LA PROTEINA DI MATRICE P17 DI HIV INDUCE L'ATTIVAZIONE DEL FATTORE TRASCRIZIONALE AP-1 ED AUMENTA LA PRODUZIONE DI CHEMOCINE PROINFIAMMATORIE IN MONOCITI PRIMARI UMANI.

Fiorentini S., Marini E., Caracciolo S., Tosti G., Avolio M., Caruso A.  
*Cattedra di Microbiologia, Università di Brescia*

La replicazione di HIV è il risultato di una complessa interazione tra fattori virali e dell'ospite. Di recente abbiamo dimostrato che la proteina di matrice p17 di HIV partecipa, a seguito del legame ad un recettore cellulare (p17R), all'instaurarsi di una forte attivazione linfocitaria, accompagnata dalla produzione di citochine proinfiammatorie. I risultati fin qui ottenuti lasciano supporre che p17 possa esercitare i propri effetti attivatori anche su altre cellule purchè esse esprimano p17R sulla propria superficie. Obiettivo di questo lavoro è stato quello di verificare se p17 sia in grado di indurre attivazione delle cellule della linea monocito/macrofagica che rappresentano il principale reservoir di HIV. A questo scopo abbiamo inizialmente dimostrato che p17R è presente sui monociti primari. L'analisi fenotipica dei monociti circolanti ottenuti da una coorte di 30 donatori ha infatti evidenziato che essi esprimono costitutivamente p17R e che la densità di p17R/cellula aumenta dopo attivazione con IFN- $\gamma$  o LPS. Il trattamento di monociti purificati con p17 determina inoltre un incremento dell'espressione di HLA-DR e CCR5, indicando un contributo della proteina virale all'attivazione monocitaria. Si può quindi ipotizzare una sinergia d'azione tra p17, IFN- $\gamma$  ed altre molecole infiammatorie atte ad incrementare l'attivazione monocitaria. Sono stati poi eseguiti studi volti a stabilire se e quali fattori trascrizionali vengono attivati a seguito dell'interazione p17/p17R. Saggi di Protein/DNA Array e saggi EMSA eseguiti su estratti nucleari ottenuti da monociti primari purificati da buffy coats hanno evidenziato che p17 attiva in modo specifico il fattore trascrizionale AP-1. Il trattamento con p17 induce inoltre una sovraespressione di MCP-1 ed IL-8 mentre la produzione di chemochine anti-HIV (RANTES) rimane inalterata.

I risultati ottenuti indicano che p17 induce attivazione dei monociti e questo fenomeno potrebbe generare un loop autocrino/paracrino capace di sostenere la stimolazione monocitaria e, di conseguenza, favorire la loro suscettibilità cellulare all'infezione da HIV e/o la produzione virale.

## RISCONTRO DI HPV DNA IN BRUSHING PENIENO, TAMPONE URETRALE E LIQUIDO SEMINALE DI PARTNERS DI DONNE HPV POSITIVE: ANALISI DELLA PREVALENZA E DELLA CONCORDANZA TIPO-SPECIFICA NELLA COPPIA

L.Giovannelli<sup>1)</sup>, G.Capra<sup>1)</sup>, M.P. Caleca<sup>1)</sup>, M.C. Migliore<sup>1)</sup>, A. Perino<sup>2)</sup>, P. Ammatuna<sup>1)</sup>. Dipartimento di Igiene e Microbiologia<sup>1)</sup>, Dipartimento Materno Infantile<sup>2)</sup>; Università degli Studi di Palermo, Palermo.

Pochi studi sino ad oggi stati condotti sull'infezione genitale da papillomavirus umano (HPV) nell'uomo, anche a causa della incertezza su quale sia il campione clinico più adeguato da esaminare. Inoltre, poche informazioni sono disponibili per quanto riguarda l'aspetto dell'infezione da HPV nelle coppie. Nel presente studio è stata ricercata la presenza dell'HPV DNA in campioni di cellu brushing penieno (PE), tampone uretrale (TU) e liquido seminale (LS) di 50 partners monogami e stabili di altrettante donne con infezione cervicale da HPV, quest'ultima associata o meno a presenza di lesioni squamose cervicali (SIL). L'HPV DNA è stato ricercato mediante test di amplificazione/ibridazione HPV-INNOLiPA (Innogenetics) e amplificazione *nested* con primers MY09/11 e GP05+/06+, quest'ultima seguita da sequenziamento genomico.

Dei tre siti analizzati, 46 (92.0%) PE, 48 (96.0%) TU e 44 (88.0%) SE erano  $\beta$ -globina positivi; in tali campioni, l'HPV-DNA è stato riscontrato in 32/46 (69.5%) PE, 18/48 (37.5%) TU e 12/44 (27.3%) SE. Combinando questi dati, 36/50 (72.0%) dei partners erano HPV positivi: 16 (44.4%) solo in un campione, 14 (38.9%) in due e 6 (16.6%) in tre. In ordine di frequenza di riscontro, i genotipi HPV sono stati HPV-31, -53, -68, -6 e -58. Infezioni multiple erano presenti in 20 (44.4%) partners HPV positivi. Non è stata evidenziata maggiore frequenza d'infezione da HPV nei partners di donne con SIL cervicali, rispetto a quelli delle donne senza SIL. Nelle 36 coppie con entrambi i partners HPV positivi, lo stesso genotipo di HPV è stato riscontrato in 22 casi (62.1%). In quattro coppie, il partner maschile era positivo per genotipi oncogeni (HPV-16, -59, -68, -58), mentre nella donna erano presenti solo HPV a basso rischio oncogeno.

Il brushing penieno è risultato il campione più adeguato per la ricerca di HPV DNA nell'uomo, in paragone al tampone uretrale e al liquido seminale. I partners di donne positive rappresentano una popolazione ad alto rischio d'infezione e a loro volta possono rappresentare fonte di (re)infezione per le partners. Ulteriori studi sono necessari per spiegare il riscontro di diversi genotipi di HPV nelle coppie monogame.

## DUE SAGGI DI PCR A CONFRONTO PER LA DIAGNOSI RAPIDA DI AMEBIASI.

Calderaro A., Gorrini C., Bommezzadri S., Piccolo G., Dettori G., Chezzi C.

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma.

**Introduzione.** L'identificazione di *Entamoeba histolytica*, agente eziologico di amebiasi intestinale ed extraintestinale, è di estrema importanza ai fini di una diagnosi corretta e di una terapia mirata. *Entamoeba histolytica* è morfologicamente identica alla specie non patogena *E. dispar*; pertanto si rendono necessari metodi specifici in grado di distinguerle. Qui riportiamo il confronto tra due saggi di PCR per l'identificazione di *E. histolytica* e *E. dispar* in campioni di pazienti con sospetta parassitosi.

**Metodi.** Il DNA estratto da 163 campioni (155 campioni di feci, 7 campioni di liquido da ascessi epatici e una biopsia intestinale) appartenenti a 108 pazienti, italiani e stranieri, è stato sottoposto ad un saggio di PCR convenzionale e ad un saggio di Real-Time PCR per l'identificazione di *E. histolytica* e *E. dispar*. Gli stessi campioni sono stati sottoposti a esame parassitologico completo comprensivo di coltura per protozoi intestinali.

**Risultati.** I due saggi di PCR hanno dato risultati concordanti: sono stati diagnosticati 6 casi di amebiasi da *E. histolytica* e 9 casi di infezione da *E. dispar*. Il confronto tra i risultati degli esami microscopico e colturale e dei saggi di PCR ha rivelato che questi ultimi sono più sensibili e specifici dei metodi tradizionali i quali, nella nostra esperienza, hanno sottostimato le infezioni da *E. histolytica* e *E. dispar*.

**Discussione.** I saggi di PCR si sono rivelati sensibili, specifici, vantaggiosi in termini di costo-beneficio e applicabili per la diagnosi di amebiasi in pazienti italiani e stranieri provenienti da aree endemiche per amebiasi. Questi saggi permettono una diagnosi rapida, accurata e consentono di instaurare prontamente una terapia mirata dell'amebiasi che se non tempestivamente diagnosticata e trattata può risultare letale. Inoltre, tali saggi si sono dimostrati utili per ottenere informazioni, attualmente scarse, riguardanti l'epidemiologia delle infezioni da *E. histolytica* e *E. dispar* in paesi non endemici come l'Italia, in accordo con le raccomandazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità.

## ESPRESSIONE DI GENI COINVOLTI CON L'APOPTOSI IN PAZIENTI HIV+ SOTTOPOSTI ALLA TERAPIA HAART

Balestrieri E.<sup>1</sup>, Grelli S.<sup>2</sup>, Matteucci C.<sup>2</sup>, Minutolo A.<sup>2</sup>, d'Ettore G.<sup>3</sup>, Di Sora F.<sup>4</sup>, Montella F.<sup>4</sup>, Vullo V.<sup>3</sup>, Vella S.<sup>5</sup>, Favalli C.<sup>2</sup>, Macchi B.<sup>1</sup>, Mastino A.<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Neuroscienze, e <sup>2</sup>Dip. di Medicina Sperimentale e Sc.Bioch., Univ. di Roma 'Tor Vergata', Roma; Dip. di Malattie Infettive e Tropicali, Univ. di Roma 'La Sapienza', Roma;<sup>4</sup>Unità di Immunol. Clinica, Osp. S. Giovanni, Roma; <sup>5</sup>Istituto Superiore di Sanità, Roma; <sup>6</sup>Dip. di Sc. Microbiologiche, Genetiche e Molecolari, Univ. di Messina, Messina.

In precedenti studi abbiamo messo in evidenza il pronto ripristino dei livelli di apoptosi spontanea dei linfociti di pazienti HIV+ naive immessi in terapia HAART. Abbiamo voluto utilizzare la stessa strategia di indagine longitudinale per ottenere ulteriori informazioni, a livello di espressione genica, sui meccanismi che regolano le capacità intrinseche di HIV di determinare morte cellulare e sopravvivenza dei linfociti, nel corso della terapia. L'analisi quantitativa dell'espressione genica è stata eseguita su linfomonociti di sangue periferico ottenuti da una coorte di 12 pazienti HIV+, controllati prima dell'ingresso in terapia (tempo 0) e a 3, 6 mesi e 1 anno dall'ingresso in terapia, mediante la metodica di "RNA-protection-assay" per un pannello comprendente 19 geni. I risultati sono stati posti in relazione anche con i parametri virologici ed immunologici e valutati mediante analisi statistica. Per alcuni geni (*caspari 8, fas, fasL bcl-2*), è stata confermata la rispondenza con quanto già osservato. Per altri geni, per cui i dati in letteratura erano meno chiari, i risultati hanno dimostrato che l'espressione di *mfR1* e *trail* tende a diminuire nel tempo mentre l'espressione del gene *bcl-xL* ad aumentare. Per geni pro-apoptotici quali *fadd, fafl, tradd, dr3* e il gene *bax*, per cui non esistevano dati da pazienti in terapia, la loro espressione va a decrescere con il procedere della terapia, mentre l'espressione del gene della proteina antiapoptotica Mcl-1 va ad aumentare. Infine, per un gruppo di geni (*p53, p21, gadd, c-fos, rip e fap*) l'espressione non è risultata essere modificata in corso di terapia. Il quadro complessivo che emerge è quello che le modificazioni nei livelli di morte prematura dei linfociti che osservano in conseguenza della progressione della malattia e poi, in direzione opposta, in conseguenza della caduta della carica virale successiva alla risposta alla terapia, siano il risultato di una complessa, ma logica e coerente, rete di segnali che regolano in modo multifattoriale la morte/sopravvivenza dei linfociti durante l'infezione da HIV.

## L'AUSILIO DELLA BIOLOGIA MOLECOLARE NELLA SORVEGLIANZA DELL'INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS NEI TRAPIANTATI D'INTESTINO.

Lazarotto T\*, Pinna AD<sup>#</sup>, Gabrielli L\*, Lauro A<sup>#</sup>, De Ruvo N<sup>#</sup>, Dazzi A<sup>#</sup>, Monari P\*, Vaccari C\*, Pop S\*, Landini MP\*.

\*Dipartimento di Medicina Clinica Specialistica e Sperimentale - Sezione di Microbiologia, <sup>#</sup>Dipartimento di Chirurgia dei Trapianti di Fegato e Multiorgano, Policlinico S. Orsola Malpighi, Università degli Studi di Bologna.

Uno dei più evidenti fenomeni nella biologia dei trapianti è l'inusuale severità e letalità dell'infezione da Citomegalovirus (CMV) nei trapiantati di intestino, tra le principali cause di enterite acuta.

Questi pazienti vengono sottoposti ad intense e prolungate terapie immunosoppressive in quanto frequenti e molto severi sono gli episodi di rigetto acuto. Non è ancora chiarissima la ragione, ma è l'organo trapiantato il principale target per l'infezione e la malattia da CMV inoltre, l'alterata permeabilità della mucosa intestinale favorisce la disseminazione ematica di CMV con la possibilità di coinvolgimento di altri organi.

Questo studio ha valutato il valore diagnostico e prognostico del ritrovamento e quantificazione di CMV nei campioni di sangue e nelle biopsie intestinali ottenuti dai pazienti nel monitoraggio della fase post trapianto. Lo scopo era quello di controllare la fase di disseminazione di CMV e di valutare un intervento precoce con terapia presintomatica anche al ritrovamento positivo delle biopsie intestinali.

Sono stati posti in sorveglianza 27 pazienti trapiantati di intestino (26 R+/D+ e 1 R-/D+). Il monitoraggio della fase viremica di CMV è stato condotto con il test dell'antigenemia. La quantificazione del DNA di CMV nei campioni biotici è stata eseguita mediante PCR-Real Time (metodologia TaqMan). 502 e 353 sono rispettivamente il numero di campioni di sangue e di biopsie intestinali processati. I pazienti sono stati sottoposti a profilassi con ganciclovir per almeno 6 mesi dopo il trapianto.

La prevalenza dell'infezione da CMV documentata dagli esami virologici è risultata pari al 22% (6/27) e dei 6 pazienti infetti, 2 hanno presentato una grave infezione sintomatica da CMV (enterite) che ha portato in un caso il rigetto dell'organo, 2 hanno presentato una lieve infezione sintomatica (febbre) e 2 erano asintomatici.

I risultati ottenuti hanno indicato che i pazienti trapiantati di intestino devono essere strettamente monitorati per periodi molto lunghi e controllando non solo la fase ematica ma anche l'organo trapiantato, nei ricevuti positivi i valori soglia del carico virale utilizzati per l'inizio della terapia presintomatica sono più bassi rispetto a quelli osservati in altri tipi di trapianto d'organo.

## **SVILUPPO ED UTILIZZO DI UN SAGGIO CELLULARE AD ALTA RESA PER L'IDENTIFICAZIONE DI INIBITORI DELL'ESPRESSIONE DELLE ONCOPROTEINE E6 ED E7 DI HPV-16**

D. Lembo, M. Donalisio, M. Cornaglia, T. Musso, S. Landolfo.

*Dipartimento di Sanità Pubblica e di Microbiologia, Università degli Studi di Torino.*

*Razionale ed obiettivi.* Nonostante siano stati sufficientemente elucidati i principali meccanismi coinvolti nella patogenesi dei tumori causati da HPV, non sono attualmente disponibili dei farmaci per il loro trattamento. Al fine di facilitare il processo di ricerca di sostanze anti-HPV, abbiamo sviluppato un saggio cellulare che permette lo screening ad alta resa di banche di molecole per identificare inibitori dell'espressione delle oncoproteine E6 ed E7 di HPV ad alto rischio. Tali proteine, infatti, sono responsabili dell'induzione e del mantenimento del fenotipo trasformato.

*Metodi.* Il sistema indicatore che abbiamo sviluppato è costituito da una linea cellulare di cheratinociti umani (HaCaT) trasfettati stabilmente con un plasmide ricombinante contenente il gene Luciferasi posto sotto il controllo trascrizionale della sequenza LCR di HPV-16, la quale contiene l'enhancer/promoter dei geni E6 ed E7. In questo sistema, l'attività luciferasica è una misura proporzionale dell'attività trascrizionale della sequenza LCR.

*Risultati e conclusioni.* Il saggio può essere vantaggiosamente impiegato in un processo di screening poiché possiede le seguenti caratteristiche: STABILITA' (l'attività luciferasica basale non è variata dopo 100 giorni in coltura continua), AFFIDABILITA' (ha identificato inibitori noti della sequenza LCR), COMPATIBILITA' con un formato ad alta resa (l'analisi può essere condotta in piastre a 96 pozzetti). Il saggio è stato impiegato nello screening di una collezione di più di trenta fattori solubili umani tra cui citochine anti- e pro-infiammatorie, chemochine e fattori di crescita. Le molecole che hanno inibito più del 50% l'attività trascrizionale dell'LCR sono: IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, IL-4 e IL-13. Mediante RT Real-Time PCR abbiamo dimostrato che le molecole identificate dal saggio inibiscono effettivamente l'espressione dei geni E6 ed E7 nelle cellule umane HPV-positive CasKi, derivate da un carcinoma della cervice uterina. Il saggio che abbiamo sviluppato ha consentito il primo studio sistematico sull'attività di fattori solubili nei confronti dell'espressione delle oncoproteine di HPV-16, pertanto, riteniamo che possa rappresentare un utile strumento nel processo di ricerca e sviluppo di farmaci anti HPV.

## **RELAZIONE FRA CARICHI VIREMICI TOTALI E GENOGRUPPI INFETTANTI IN SOGGETTI CON INFEZIONE CRONICA DA TTV**

F. Maggi, E. Andreoli, S. Meschi, J. Rocchi, L. Lanini, M.L. Vatteroni, M. Pistello, M. Bendinelli. Sezione Virologia e Centro Retrovirus, Dipartimento di Patologia Sperimentale, Università di Pisa, Pisa.

I membri del genere "floating" *Anellovirus* costituiscono un vasto insieme di piccoli virus a singolo filamento di DNA circolare molto simili ai circovirus animali. Sebbene spesso si faccia loro riferimento collettivamente con la sigla TTV, acronimo del virus prototipo torquetenovirus, e sebbene essi abbiano rilevanti proprietà genomiche a comune, si tratta di entità geneticamente molto divergenti attualmente classificati in almeno 5 genogruppi principali e più di 40 genotipi. L'infezione, estremamente diffusa e caratterizzata da una marcata, forse costante tendenza a persistere indefinitamente, si manifesta con viremie plasmatiche di varia entità ma spesso assai elevate e sostenute dalla concomitante presenza di più forme virali. Tuttavia le relazioni che possono intercorrere fra numero e identità dei genogruppi infettanti da una parte e livelli di TTV dall'altra non sono ancora state studiate. In questo studio, il plasma di 300 soggetti, fra donatori sani e pazienti con differenti patologie, è stato esaminato per la presenza di TTV mediante una real-time PCR capace di amplificare e quantificare con pari efficienza tutte le sequenze del virus fino ad oggi conosciute. Il TTV presente nei campioni positivi è stato poi caratterizzato utilizzando 5 diverse PCR disegnate in differenti regioni del genoma virale e ciascuna specifica per un diverso genogruppo. TTV è stato riscontrato a titoli molto variabili in 267 soggetti (89%) e in 239 (80%) di questi è risultato caratterizzabile mediante l'approccio utilizzato. I soggetti portatori di un unico genogruppo sono stati 73 e non hanno mostrato differenze nei titoli viremici indipendentemente dal genogruppo virale presente. Nei 166 soggetti con più di un genogruppo, la carica viremica totale è stata mediamente più elevata di quanto atteso sulla base di semplici effetti additivi. Ciò ha caratterizzato in modo particolare le coinfezioni sostenute dai genogruppi 1 e 3, suggerendo così l'esistenza di una qualche forma di sinergia fra questi due gruppi genetici, sinergia che potrebbe contribuire a spiegare come mai essi sono quelli nettamente più prevalenti. Nel complesso, i risultati hanno messo in luce l'esistenza di interessanti relazioni fra complessità genetica degli anellovirus infettanti e loro carico plasmatico totale. Allorché s'indaga sul potenziale patogeno di questi virus, è quindi necessario tenere sotto attenzione anche questi parametri.

## PRODUZIONE DI E PROTEZIONE DA UN PEPTIDE KILLER ANTIMICROBICO IN PIANTE INFETTATE CON UN VIRUS CHIMERICO DELLA PATATA.

Magliani W.<sup>1</sup>, Conti S.<sup>1</sup>, Donini M.<sup>2</sup>, Lico C.<sup>2</sup>, Baschieri S.<sup>2</sup>, Benvenuto E.<sup>2</sup>, Polonelli L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Università di Parma. <sup>2</sup> ENEA-Casaccia, UTS Biotecnologie, Protezione della Salute e degli Ecosistemi, Sezione Genetica e Genomica Vegetale, C.R. Casaccia, Roma.

Un decapeptide sintetico (KP), ingegnerizzato sulla base della sequenza di un anticorpo antiidiotipico ricombinante immagine interna di una tossina killer di lievito ad ampio spettro antimicrobico, in precedenti studi aveva dimostrato una significativa attività microbocida *in vitro* e terapeutica in modelli animali nei confronti di importanti microrganismi patogeni umani procarioti ed eucarioti. In questo studio è stata, innanzitutto, dimostrata una significativa attività antimicrobica *in vitro* di KP nei confronti di importanti agenti batterici e fungini fitopatogeni, quali *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e pv. *tabaci*, *P. corrugata*, *Erwinia carotovora*, *Botrytis cinerea* e *Fusarium oxysporum*. La sequenza codificante KP è stata introdotta in un vettore di espressione transitoria derivato dal virus X della patata (PVX), in modo che il peptide fosse espresso come proteina di fusione con la proteina capsidica virale, determinando la produzione di particelle virali chimeriche (CPV) esprimenti KP sul capsido. Tali CPV, utilizzate per infettare piante di *Nicotiana benthamiana* e successivamente purificate, hanno dimostrato di esplicare *in vitro* una attività antimicrobica, anche maggiore del solo KP, nei confronti sia dei fitopatogeni precedentemente menzionati sia di patogeni umani, quali *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Piante infettate con tali CPV e cimentate con un agente fitopatogeno, quale *P. syringae* pv. *tabaci*, sono risultate protette nei confronti dell'infezione batterica. Il sistema di espressione messo a punto rappresenta un metodo rapido, efficiente e redditizio per produrre peptidi antimicrobici attivi e potrebbe costituire un nuovo approccio per la produzione di piante transgeniche resistenti ad un ampio spettro di agenti microbici fitopatogeni.

## ATTIVITA' BATTERICIDA DELLA $\beta$ -DEFENSINA 3 DELL'UOMO VERSO CEPPI BATTERICI ISOLATI IN AMBIENTE OSPEDALIERO E MULTIRESISTENTI AI FARMACI

G. Maisetta, G. Batoni, S. Esin, M. Di Luca, W. Florio, D. Bottai, F. Favilli, M. Campa

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

I peptidi antimicrobici naturali rappresentano un componente essenziale del sistema immunitario innato di organismi appartenenti a diversi livelli della scala evolutiva. Essi presentano, infatti, una spiccata attività antimicrobica diretta verso un'ampia varietà di microrganismi quali batteri Gram+, batteri Gram -, funghi, parassiti e virus. Negli ultimi anni, grande interesse ha suscitato lo studio dei peptidi antimicrobici quale nuova classe di agenti antimicrobici ad uso terapeutico. Tale interesse è giustificato dalla crescente comparsa e rapida diffusione di microrganismi patogeni resistenti ai farmaci antimicrobici convenzionali, un fenomeno che rappresenta, attualmente, un grave problema di salute pubblica. Nel presente studio è stata valutata l'attività battericida della beta defensina 3 (hBD-3), un peptide cationico di 5kDa prodotto da diversi tipi di tessuto dell'uomo, verso ceppi di *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* ed *Acinetobacter baumannii* multiresistenti ai chemioantibiotici ed isolati da pazienti ospedalizzati. I risultati dei saggi di batteriocidia hanno indicato che hBD-3, dopo 1.5h di incubazione, è dotata di attività battericida verso tutti i ceppi saggiati a concentrazioni comprese tra 4 e 8  $\mu\text{g/ml}$ . Allo scopo di valutare se l'effetto battericida osservato potesse essere ottenuto a tempi più precoci, sono state effettuate cinetiche di *killing* di hBD-3 verso un singolo ceppo batterico, rappresentativo di ciascuna specie utilizzata nello studio. I risultati hanno indicato che hBD-3, saggiata a concentrazioni di 4-16  $\mu\text{g/ml}$ , ha un effetto battericida molto rapido (dopo 1-10 min d'incubazione). E' stata valutata, inoltre, l'attività battericida di hBD-3 in presenza di siero (20%) verso *A. baumannii* ed *E. faecium*. In tali condizioni, hBD-3 è risultata inattiva verso *A. baumannii*, mentre ha mantenuto, anche se parzialmente inibita (MBC=64  $\mu\text{g/ml}$ ), l'attività battericida verso *E. faecium*. Sebbene ulteriori studi siano necessari per identificare porzioni del peptide meno sensibili all'azione inibente del siero, la spiccata suscettibilità ad hBD-3 di ceppi batterici resistenti alla gran parte dei comuni chemioantibiotici rende tale peptide un interessante agente antimicrobico per un potenziale uso nella terapia delle infezioni da batteri multiresistenti.

## RAPPORTO DI DUE CASI FATALI DI ENTERITE DA ROTAVIRUS.

Medici<sup>1</sup> M.C., Corradi D.<sup>2</sup>, Ricci R.<sup>2</sup>, Del Sante M.<sup>3</sup>, Dodi I.<sup>4</sup>, De Fanti A.<sup>4</sup>, Martinelli M.<sup>1</sup>, Abelli L.A.<sup>1</sup>, Zerbini L.<sup>1</sup>, Arcangeletti M.C.<sup>1</sup>, Pinardi F.<sup>1</sup>, De Conto F.<sup>1</sup>, Aloisi A.<sup>1</sup>, Dettori G.<sup>1</sup> e Chezzi C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sezione di Microbiologia, <sup>2</sup>Sezione di Anatomia ed Istologia Patologica - Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, <sup>3</sup>Sez. Medicina Legale - Dipartimento di Anatomia Umana, Farmacologia e Scienze Medico Forensi - Università degli Studi di Parma, <sup>4</sup>U.O. Pediatria e Oncoematologia - Dipartimento Materno-Infantile - Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma - Viale Antonio Gramsci, 14 - 43100 Parma.

In questo studio viene riportato il ritrovamento di Rotavirus (HRV) in un liquido da svuotamento intestinale ed in un campione di feci appartenenti ad un bambino di 2 anni e ad un altro di 13 mesi, rispettivamente, entrambi deceduti in seguito ad enterite. I due casi fatali di enterite si sono verificati nell'arco di 4 giorni nel mese di aprile, quando l'incidenza di infezione da HRV in bambini ricoverati con enterite è stata del 65,3%. Il decesso è avvenuto per shock dovuto a squilibrio elettrolitico durante il trasporto all'ospedale in un caso e nell'altro dopo meno di 72 ore dal ricovero.

L'esame istologico di campioni di intestino prelevati in corso di autopsia ha evidenziato un intenso e diffuso infiltrato infiammatorio linfo-plasmacellulare della *lamina propria* con estesa disepitelizzazione e decapitazione dell'apice di alcuni villi.

Il virus è stato rivelato mediante microscopia elettronica, identificato mediante agglutinazione al lattice ed elettroforesi degli RNA genomici e tipizzato mediante RT-PCR utilizzando miscele di primers specifiche per il gene VP4 e VP7.

La tipizzazione e l'analisi elettroforetica dei ceppi di HRV rivelati nei 2 bambini deceduti hanno evidenziato trattarsi di ceppi di genotipo G1 P[8] con profili genomici "lunghi" appartenenti allo stesso elettroferotipo risultato prevalente (92,5%) nei bambini (età mediana 22 mesi) ricoverati con enterite presso l'Ospedale Maggiore di Parma da gennaio a maggio 2005.

Sebbene i bambini morti a Parma per enterite da HRV rappresentino casi eccezionali durante un periodo epidemico altrettanto straordinario, l'infezione da HRV in bambini di età <5 anni rimane un rilevante problema di sanità pubblica. Alla base della patogenesi dell'enterite fatale sostenuta da HRV sembra esserci l'ampia estensione del danno all'intestino.

## ACTIVATION OF EBV LYTIC CYCLE AFFECTS THE ACTIVITY OF CELLULAR PROTEOLITIC SYSTEMS.

Giulia Matusali, Sara Compagnone, Livia Di Renzo, Elena Mattia

*Dep. of Public Health Sciences and Dep. of Experimental Medicine and Pathology, University "La Sapienza", Roma, Italy*

Epstein Barr virus (EBV) is a human herpesvirus associated with lymphoid and epithelial malignancies. It is known that alterations in the metabolism of proteins involved in cell cycle control and apoptosis can affect cell growth and cell transformation processes. EBV, as other tumor viruses interacts with the proteolytic machinery of the proteasome-ubiquitin system through at least three viral latent proteins, LMP2A, EBNA1 and LMP1. Such interactions are functional for the maintenance of viral latency and for evading the immune response.

At present, it is unknown whether the virus interferes with the activity of cellular proteolytic systems also during the productive cycle of infection.

In order to investigate the effects of EBV lytic cycle activation on proteasomal activity, we have incubated latently-infected Burkitt's lymphoma (BL)-derived Raji cells with phorbol 12-13 dibutyrate P(BU)<sub>2</sub>, TGFβ<sub>2</sub> and *n*-butyrate, such treatment resulting in 60-70% cells expressing EBV early antigens. We report here that, following activation of EBV lytic cycle, a substantial increment of nuclear matrix proteins occurs, due to post-transcriptional mechanisms. In these cells, induction of EBV lytic cycle leads to reduced activity of the proteasome and of the tri-peptidyl peptidase II (TPPII) proteolytic system, the latter mainly active in BL cells. Western blot analysis performed on cell lysate before and after the addition of the inducers, indicates a significant decrement of the 20S catalytic complex of the proteasomal machinery as well as of the TPPII proteolytic subunits. In contrast, the 19S proteasome modulator complex appears to progressively increase during activation of EBV lytic cycle. Moreover, a survey of total cellular proteins with an anti-ubiquitin antibody, shows an increase of ubiquitinated species upon induction of EBV lytic cycle.

Taken together our data indicate that EBV activation impairs the activity of cellular proteolytic systems. The possible implications of these results will be discussed.

## CARATTERIZZAZIONE DI UN CEPPLO MRSA, PRODUTTORE DI TOSSINA PANTON-VALENTINE, RESPONSABILE DI POLMONITE NECROTIZZANTE

Monica Monaco\*, Rosa Antonucci §, Paolo Palange§, Mario Venditti§, Annalisa Pantosti\*

\*Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma; §Dipartimento di Medicina Clinica, Università La Sapienza, Roma

Negli ultimi anni si è assistito, in varie parti del mondo, all'emergenza di infezioni sostenute da *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente acquisito in comunità (CA-MRSA). I ceppi CA-MRSA rispetto ai ceppi MRSA ospedalieri sono sensibili alla maggior parte degli antibiotici non beta-lattamici e sono caratterizzati dalla presenza di fattori di virulenza specifici tra i quali le tossine Panton-Valentine (PVL) e  $\gamma$ -emolisina che hanno proprietà leucotossiche ed emolitiche e sono codificate dai geni *lukS-PV-lukF-PV* e *hlg* rispettivamente. Nei pazienti con infezioni da CA-MRSA generalmente non si osservano fattori di rischio associati. Nel mese di aprile 2005 una donna di 37 anni è stata ricoverata presso il Policlinico Umberto I di Roma con sintomi di febbre, tosse e cefalea. L'esame radiografico rivelava la presenza di lesioni cavitari multiple indicative di polmonite necrotizzante. Dall'esame microbiologico dell'espettorato si riscontrava la presenza di *S. aureus*. Il ceppo isolato è stato caratterizzato per il profilo di antibiotico-resistenza mediante metodi automatizzati e test di microdiluizione in brodo; la presenza dei geni per la PVL e per la  $\gamma$ -emolisina è stata rilevata utilizzando saggi di PCR. Il tipo strutturale dell'elemento *SCCmec* è stato determinato mediante PCR multipla. Il background genetico del ceppo è stato analizzato attraverso MLST e analisi della sequenza della regione dei tandem repeat della proteina A (*spa* type). Il ceppo è risultato resistente alla meticillina e sensibile a tutti gli antibiotici non beta-lattamici, inclusi eritromicina, clindamicina, ciprofloxacina, tetraciclina, kanamicina e acido fusidico. È stata messa in evidenza la presenza dei geni *lukS-PV-lukF-PV* e *hlg* e del *SCCmec* tipo IV. Il profilo allelico (MLST) del ceppo corrispondeva a ST 30 e lo *spa* type al nuovo tipo 755. L'ST 30 corrisponde ad uno dei sei cloni più frequentemente associati ai ceppi CA-MRSA PVL-positivi ed è endemico in Australia e Nuova Zelanda (area del Sud Ovest Pacifico) da cui il nome clone South West Pacific (SWP). Di recente questo clone è stato identificato anche in alcuni paesi del Nord Europa. Questo è il primo caso di CA-MRSA produttore di PVL responsabile di polmonite necrotizzante descritto in Italia. Per la prima volta un ceppo appartenente al clone SWP è stato trovato nel Sud dell'Europa.

## ATTIVITA' IN VITRO ED IN VIVO DEL TERPINEN-4-OLO, COMPONENTE DELL' OLIO ESSENZIALE DI MELALEUCA ALTERNIFOLIA (TEA TREE OIL) NEI CONFRONTI DI CANDIDA ALBICANS, SENSIBILE O RESISTENTE AGLI IMIDAZOLICI.

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

\*Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, \*\*Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, ROMA.

Varie sostanze di origine naturale, in particolare gli oli essenziali hanno dimostrato di possedere attività antimicrobiche, di potenziale utilità terapeutica. Il "tea tree oil" (TTO), un olio essenziale ottenuto dalle foglie di *Melaleuca alternifolia*, si è dimostrato attivo in vitro ed in vivo, ed è stato utilizzato per il trattamento delle micosi, in particolare della candidiasi vulvo-vaginale, infezione spesso ricorrente e resistente alla terapia antimicotica convenzionale. Prove dell'efficacia dei singoli componenti del TTO in vivo non sono state ancora ottenute e chiaramente riportate in studi controllati. Per tale ragione, abbiamo valutato l'attività in vitro del TTO, del terpinene-4-olo e dell'1,8-cineolo in 49 isolati clinici di *Candida albicans* sensibili e resistenti al fluconazolo (FCZ) e/o all'itraconazolo (ITR) ed in 11 ceppi di riferimento ATCC appartenenti a varie specie di lievito. Le stesse preparazioni di TTO e di terpinene-4-olo sono state saggiate in vivo in un modello di vaginite sperimentale con ratte ovariectomizzate e mantenute sotto estrogeni (De Bernardis F. et al. Infect. Immun. 1997, 65:3399-3405). Le MIC<sub>90</sub> del terpinene-4-olo (0.06 % v/v) e dell'1,8-cineolo (4% v/v) sono risultate in vitro, rispettivamente, due diluizioni più elevate e quattro diluizioni inferiori rispetto all'attività antifungina del TTO (MIC<sub>90</sub>= 0.25% v/v) per tutti i ceppi di *C. albicans* sensibili. I 14 ceppi di *C. albicans* resistenti a FCZ e/o ITR hanno mostrato MIC<sub>90</sub> per il terpinene-4-olo (0.06% v/v) e per l'1,8-cineolo (4% v/v) rispettivamente tre diluizioni più elevate e tre diluizioni inferiori all'attività antifungina del TTO (MIC<sub>90</sub>= 0.5% v/v). Terpinene-4-olo è risultato molto efficace nell'eliminazione del fungo dalla vagina delle ratte. Tre dosi post-challenge di terpinene-4-olo all'1% (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 suggeriscono che gli effetti antifungini in vitro ed in vivo del TTO sono almeno in parte dovuti all'attività del terpinene-4-olo.

## **RUOLO DELLE CELLULE DENDRITICHE NELLA PATOGENESI DEL GRANULOMA DA *BARTONELLA HENSELAE*.**

Musso T\*, Riboldi E°, Scutera S\*, Daniele R\*, Stornello S\*, Ravarino D\*, Vermi W<sup>+</sup>, Badolato R<sup>§</sup>, Sozzani S°, Zucca M<sup>^</sup>, Negro Ponzi A\*.

\*Dip. di Sanità Pubblica e di Microbiologia, ^Dip. di Scienze Cliniche e Biologiche, Università di Torino; °Sezione di Patologia Generale e Immunologia, + Dip. di Patologia, §Dip. di Pediatria, Università di Brescia.

Il granuloma causato da *B. henselae* associato alla malattia da graffio di gatto (CSD) è marcatamente diverso per quanto riguarda la morfologia e la componente cellulare dai granulomi di tipo tubercolare (o da ipersensibilità). Questi ultimi sono composti da macrofagi e linfociti T, mentre i primi, di tipo suppurativo, sono composti prevalentemente da neutrofili e linfociti B.

Nell'ambito della protezione contro le malattie infettive, le reazioni granulomatose linfonodali controllano la diffusione sistemica dei germi patogeni costituendo uno stadio importante della fase effettrice dalla risposta immunitaria. Le cellule dendritiche (DC) hanno la peculiare capacità di indurre una potente stimolazione del sistema immunitario in risposta all'antigene.

In questo studio abbiamo analizzato l'effetto dell'infezione da *B. henselae* su DC in vitro e la composizione cellulare di granulomi da pazienti con CSD. I risultati dimostrano che dopo l'infezione in vitro le DC secernono chemochine attive sui neutrofili (CXCL8 e CXCL1) e CXCL13, che è un potente segnale chemiotattico per i linfociti B. Inoltre numerose cellule CXCL13 positive classificabili come DC per morfologia e per l'espressione di CD11c e CD14 sono state identificate nei granulomi, inframmezzate a linfociti B CD20<sup>+</sup>. E' interessante notare che non abbiamo riscontrato espressione di CXCL13 nei granulomi da ipersensibilità analizzati per controllo. Abbiamo anche dimostrato che i linfociti B riscontrati nei granulomi sono del tipo monocitoidi (CD20<sup>+</sup>, TCL1<sup>-</sup>, IgD<sup>-</sup>, BCL2<sup>-</sup>, BCL6<sup>-</sup>) ed esprimono T-bet, un fattore di trascrizione coinvolto nello scambio isotipico T-indipendente dei linfociti B. Questi risultati indicano che le citochine e le chemochine prodotte nel granuloma da DC infettate con *B. henselae* possono attrarre cellule B monocitoidi e indurne la differenziazione in plasmacellule.

## **IL GALATTOXILOMANNANO, COMPONENTE DELLA CAPSULA POLISACCARIDICA DEL *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*, INDUCE APOPTOSI DEI LINFOCITI T UMANI TRAMITE L'ATTIVAZIONE DELLA CASPASI-8**

Eva Pericolini, Elio Cenci, Claudia Monari, Francesco Bistoni, Anna Vecchiarelli

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

Il principale fattore di virulenza del *Cryptococcus neoformans* è la capsula polisaccaridica composta da glucuronoxilomannano (GXM), galattosilomannano (GalXM) e mannoproteine. Sono state evidenziate differenti attività immunomodulatorie attribuite al GXM e alle mannoproteine ma poco è noto sulle possibili interazioni del GalXM con il sistema immune. Nel presente lavoro abbiamo indagato l'effetto del GalXM purificato solubile su linfociti T umani. I risultati indicano che il GalXM: i) interagisce direttamente con i linfociti T, ii) causa una significativa diminuzione della proliferazione dei linfociti T e un' aumentata produzione di IFN- $\gamma$  e IL-10, iii) induce apoptosi dei linfociti T tramite l'attivazione della caspasi-8 e conseguente frammentazione del DNA.

Questi risultati sono i primi a dimostrare il ruolo del GalXM nel limitare e/o impedire un'efficace risposta T cellulare specifica, tramite l'interazione con i linfociti T umani.

## SAGGI MOLECOLARI RAPIDI PER LA DIAGNOSI DI SPIROCHETOSI INTESTINALE: TRE ANNI DI ESPERIENZA A PARMA.

Calderaro A., Bommezzadri S., Gorrini C., Piccolo G., Peruzzi S., Villanacci V.<sup>1</sup>, Dettori G., Chezzi C.

Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma; <sup>1</sup>Secondo Servizio di Anatomia Patologica, Spedali Civili, Brescia.

**Introduzione.** Il genere *Brachyspira* comprende specie patogene per l'uomo e gli animali. Nell'uomo la spirochetosi intestinale è causata dalle specie *B. pilosicoli* e *B. aalborgi*. Il presente studio riporta la descrizione dei casi di spirochetosi diagnosticati nel nostro laboratorio negli ultimi tre anni.

**Materiali e Metodi.** In questo studio sono stati analizzati 70 pazienti che presentavano diarrea cronica mucosa e/o ematica di origine sconosciuta di durata superiore a 6 mesi: di 68 pazienti erano disponibili campioni di feci e per 6 di questi pazienti anche numerose biopsie coliche; per 1 paziente erano disponibili solo biopsie coliche e per 1 paziente, deceduto per tromboembolia polmonare, un segmento del colon discendente. Le biopsie intestinali di 8 pazienti sono state sottoposte ad esame istologico. I campioni sono stati utilizzati per l'isolamento delle brachyspire in terreno selettivo BAM-SR. Il DNA è stato estratto da campioni di feci, biopsie, colture pure di spirochete e sottoposto a 16SRFLP-PCR. Un saggio *noxRFLP-PCR* è stato valutato per la prima volta per l'identificazione di *B. pilosicoli* e *B. aalborgi* in campioni di origine umana.

**Risultati.** L'esame istologico delle biopsie intestinali degli 8 pazienti ha evidenziato l'adesione di microrganismi spiraliformi agli enterociti. Sono stati identificati 14 casi di infezione da *Brachyspira* (3 bambini e 11 adulti). Sono stati isolati e identificati 5 ceppi di *B. aalborgi*, 2 ceppi di *B. pilosicoli* e due infezioni miste (*B. aalborgi* + *B. pilosicoli*). Inoltre, 5 ceppi di *B. aalborgi* sono stati identificati, ma non isolati.

Nei casi descritti, la terapia con metronidazolo ha eradicato l'infezione. Solamente un paziente HIV positivo si è re-infettato dopo un anno e la diarrea della durata di 4 mesi è stata prontamente risolta con lo stesso farmaco.

**Discussione.** Le tecniche molecolari utilizzate si sono rivelate specifiche e sensibili. Il saggio 16SRFLP-PCR ha prontamente identificato tutti i ceppi di *B. aalborgi* e di *B. pilosicoli*. Lo stesso risultato è stato confermato dal saggio *noxRFLP-PCR* anche se quest'ultimo si è rivelato meno sensibile del primo.

Il nostro studio ha fornito informazioni sulla distribuzione delle spirochete nella popolazione analizzata e suggerisce che la spirochetosi intestinale può essere più frequente di quanto sospettato e spesso non è diagnosticata poiché presenta una sintomatologia aspecifica.

## INIBIZIONE IN VITRO DELLA RETROTRASCRIZIONE DI HIV-1 MEDIANTE UN ACIDO NUCLEICO PEPTIDICO (PNA)

C.D.Pesce<sup>a</sup>, F.Bolacchi<sup>b</sup>, B.Bongiovanni<sup>a</sup>, S.Diviacco<sup>c</sup>, F.Quadrifoglio<sup>c</sup>, C. Drapeau<sup>b</sup>, F.Calò Carducci<sup>b</sup>, G.Rocchi<sup>b</sup>, A.Bergamini<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche e <sup>b</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica e Biologia Cellulare, Università di Roma "Tor Vergata".

<sup>c</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università di Udine

**Razionale e obiettivi.** Il rapido emergere di mutanti virali resistenti ai farmaci rappresenta un impedimento alla cura dell'infezione da HIV-1. Un possibile approccio che consenta di superare questo problema può consistere nel selezionare negli acidi nucleici virali sequenze altamente conservate da usare come bersagli per una recente classe di potenti analoghi nucleotidici sintetici, gli acidi nucleici peptidici (PNA). Il PNA, molecola sintetica che mima la struttura del DNA, è un analogo nucleotidico a scheletro peptidico caratterizzato da affinità molto elevata per gli acidi nucleici e da resistenza a nucleasi e proteasi. In questo studio è stata scelta come bersaglio sull'RNA virale la sequenza di inizio della retrotrascrizione di HIV-1, indicata come primer binding site (PBS), la quale lega l'innesco costituito da tRNA<sup>3Lys</sup>. L'obiettivo della ricerca consiste nell'inibire, tramite blocco dell'innesco, il processo di retrotrascrizione virale. **Metodi.** Il PNA anti-PBS è stato legato covalentemente ad un segnale di localizzazione nucleare (NLS) di natura peptidica per favorirne l'ingresso nelle cellule. L'attività anti-HIV-1 del PNA anti-PBS è stata saggiata in linee cellulari linfocitarie umane e in colture primarie di linfociti umani. L'attività antivirale del PNA è stata dimostrata dosando l'antigene p24 nei sovrinatanti delle colture e valutando la protezione dall'effetto citopatico indotto dal virus. L'effetto sulla retrotrascrizione è stato dimostrato valutando la sintesi di DNA virale mediante amplificazione enzimatica specifica (PCR). **Risultati e conclusioni.** Il PNA anti-PBS si è rivelato più efficace di AZT nell'inibire sia la produzione di antigene p24 sia l'effetto citopatico indotto dall'infezione, risultando attivo anche su isolati virali polifarmacoresistenti e non presentando tossicità alle concentrazioni efficaci. La PCR ha dimostrato completa inibizione del processo di trascrizione inversa virale suggerendo l'invasione dell'RNA duplex da parte del PNA. I risultati ottenuti, che vanno ad aggiungersi a precedenti evidenze ottenute dal nostro gruppo con un PNA anti-gene anti HIV-1, mostrano come i PNA possano rappresentare un potente strumento sul quale impostare una strategia terapeutica alternativa nel trattamento dell'infezione da HIV-1.

## VALUTAZIONE DI DIVERSI SAGGI DI PCR PER LA CORRETTA IDENTIFICAZIONE DI *P. OVALE*.

Calderaro A., Piccolo G., Zuelli C., Bommezzadri S., Perandin F.<sup>1</sup>, Ricci L.<sup>2</sup>, Manca N.<sup>1</sup>, Dettori G., Chezzi C.  
Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma;  
<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata, Cattedra di Microbiologia, Università degli Studi di Brescia;  
<sup>2</sup>Arcispedale di Reggio Emilia.

**Introduzione.** L'aumento del numero dei viaggiatori provenienti dall'Africa occidentale, zona endemica per malaria, ha causato in Italia, e parallelamente nel nostro laboratorio, un aumento della prevalenza dei casi di infezione da *P. ovale* tra i casi di malaria di importazione. In questo studio riportiamo 22 dei 106 casi di malaria diagnosticati nel periodo 1999-2004, per i quali è stato necessario l'utilizzo di differenti saggi molecolari per una corretta identificazione.

**Metodi.** Ventidue campioni di sangue di pazienti con sospetta malaria, sono stati sottoposti ad osservazione microscopica, a 18S-rDNA nested-PCR genere-specifica e a tre PCR specie-specifiche (nested-PCR 1993, 2002 e 2004) che utilizzano tre diverse coppie di "primers" per l'identificazione di *P. ovale*. Gli ampliconi ottenuti sono stati sottoposti ad analisi di sequenza.

**Risultati.** Mediante esame microscopico 3 campioni erano positivi per *P. falciparum*, 7 per *P. vivax*, 8 per *P. ovale*, 1 per *Pv/Po* e 3 erano negativi. Tutti i 22 campioni erano positivi mediante nested-PCR genere-specifica. La nested-PCR 1993 e la nested-PCR 2002 hanno identificato 14 e 17 ceppi di *P. ovale*, rispettivamente. Solo la nested-PCR 2004 ha identificato tutti i 22 campioni come appartenenti alla specie *P. ovale*: 20 infezioni singole e 2 miste (1 *Pf+Pm+Po* e 1 *Pf+Po*). L'analisi di sequenza degli ampliconi ha confermato in tutti i casi, la presenza del DNA di *P. ovale*.

**Conclusioni.** I nostri dati suggeriscono che le infezioni da *P. ovale* possono essere non diagnosticate mediante esame microscopico e 18S-rDNA PCRs. Infatti, ben tre diversi saggi di PCR specie-specifici sono stati necessari per la corretta identificazione dei 22 ceppi di *P. ovale*. L'accuratezza diagnostica raggiunta ha consentito, con costi e tempi contenuti, la corretta diagnosi di malaria da *P. ovale* e di infezioni miste da *P. ovale* con altri plasmodi, consentendo la scelta di una terapia mirata anche in considerazione del fatto che *P. ovale* è causa di malaria recidivante.

## COSTRUZIONE E VALIDAZIONE IN VITRO DI UN VETTORE VACCINALE DERIVATO DAL VIRUS DELL'IMMUNODEFICIENZA FELINA

Mauro Pistello, Laura Vannucci, Alessia Ravani, Francesca Bonci e Mauro Bendinelli.  
Centro Retrovirus e Sezione Virologia, Dipartimento di Patologia Sperimentale, Università di Pisa.

La creazione di vettori virali per veicolare geni eterologhi in vivo ha dato grande impulso allo sviluppo di strategie per correggere difetti genetici o immunizzare contro antigeni "difficili". Ad oggi sono disponibili vettori che, pur avendo subito cospicui rimaneggiamenti del genoma per abolirne patogenicità ed infettività, mantengono parte delle proprietà delle famiglie virali dai quali sono stati prodotti. Tra questi, quelli derivati dal virus dell'immunodeficienza umana (HIV) si sono distinti sin da subito per l'elevata efficienza nel veicolare in linee cellulari e colture primarie sia umane sia di specie eterologhe. In particolare, i vettori HIV-derivati sono in grado di trasdurre anche cellule in fase quiescente, condizione nella quale si trova la stragrande maggioranza delle cellule in vivo. Tuttavia, problematiche di sicurezza, quali una paventata patogenicità residua, sconsigliano l'impiego di vettori HIV-derivati nell'uomo. Il virus dell'immunodeficienza felina (FIV), pur non essendo patogeno per l'uomo, condivide con HIV molte proprietà, tra cui particolarmente importante in ambito vettorologico quella di trasdurre un ampio spettro di cellule. I vettori FIV-derivati potrebbero quindi rappresentare una valida alternativa ad HIV.

Recentemente abbiamo sviluppato un vettore FIV-derivato di terza generazione in grado di trasdurre cellule feline con alta efficienza ma poco attivo nella trasduzione di specie eterologhe. Allo scopo di allargarne il tropismo, in ulteriori studi tale costrutto vettore è stato ingegnerizzato per migliorare l'incapsidamento dell'RNA genomico nei virioni progenie ed aumentare espressione e stabilità dell'mRNA del gene eterologo. Siamo intervenuti, inoltre, sul targeting pseudotipizzando le particelle virali con proteine del pericapside derivate da virus diversi.

Le modificazioni introdotte hanno sostanzialmente migliorato le prestazioni del vettore, che è ora capace di trasdurre efficacemente anche linee cellulari e colture primarie umane e di altre specie. Risultati ottenuti e implicazioni verranno discussi alla luce di una possibile utilizzazione del vettore FIV così modificato nello sviluppo di immunogeni anti-herpes simplex tipo 1.

## MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE PROTEICA IN *STAPHYLOCOCCUS* SPP. DOPO TRATTAMENTO CON SERRATIOPEPTIDASI (SPEP)

Poggiali F.<sup>1</sup>, Scoarughi G.<sup>1</sup>, Carpentieri A., Amoresano A.<sup>2</sup>, Pucci P.<sup>2</sup>, Artini M.<sup>1</sup>, Selan L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dip. G. Sanarelli, Università di Roma La Sapienza

<sup>2</sup> Dip. Chim. Org. e Biochimica, Università di Napoli Federico II

*S. epidermidis* e *S. aureus* sono i principali responsabili delle infezioni da biofilm su protesi artificiali. Queste infezioni rappresentano un grave problema emergente nella microbiologia clinica; in questi casi è noto che le terapie antibiotiche sono scarsamente efficaci per la resistenza del fenotipo biofilm agli stress ambientali compresi gli antibiotici.

In passato abbiamo già dimostrato che batteri Gram+ e Gram- formanti biofilm cresciuti in presenza di SPEP ritornano sensibili all'azione degli antibiotici e abbiamo correlato questa osservazione con la drastica riduzione dell'espressione di alcune proteine di superficie tra cui l'autolisina AtlE di *S. epidermidis*. La modulazione di queste proteine da parte di SPEP è stata dimostrata in *S. epidermidis* mediante analisi elettroforetica in SDS-PAGE e zimogramma. In Northern Blot è stata confermata la ridotta espressione di AtlE in *S. epidermidis*.

In questo studio abbiamo proseguito le ricerche estendendole a ceppi clinici e di riferimento di *S. aureus*. Le proteine di *S. aureus* sono state estratte da ceppi lasciati in crescita fino alla fase esponenziale in presenza oppure in assenza di quantità note di SPEP. Da ogni ceppo sono state preparate tre frazioni proteiche: proteine di secrezione, proteine di superficie/membrana e proteine totali. Ai fini del nostro studio la frazione migliore corrisponde a quella delle proteine di superficie/membrana.

Anche in *S. aureus* è stata riscontrata la scomparsa di molte proteine sia in SDS-PAGE che in zimogramma. Una delle proteine regolata negativamente corrisponde all'autolisina Atl di *S. aureus* omologa di AtlE.

L'identificazione delle proteine substrato della SPEP è stato condotto utilizzando un approccio proteomico. Le proteine estratte da ceppi di *S. epidermidis* e di *S. aureus* trattati e non trattati con SPEP sono state frazionate su gel mono- e/o bidimensionale; le bande proteiche presenti solo nei campioni trattati sono state escisse dal gel e idrolizzate *in situ* con tripsina. Le miscele peptidiche risultanti sono state analizzate mediante MALDIMS secondo la procedura del peptide *mapping fingerprinting* e successivamente mediante tecniche di LC-MS/MS. I dati di massa sono stati quindi utilizzati per l'identificazione delle proteine in banca dati mediante opportuni *software* disponibili in rete.

## ATTIVITÀ TERAPEUTICA DI UN PEPTIDE SINTETICO KILLER NEI CONFRONTI DI VIRUS INFLUENZALI

Magliani W.<sup>1</sup>, Nencioni L.<sup>2</sup>, Conti G.<sup>1</sup>, Conti S.<sup>1</sup>, Sgarbanti R.<sup>3</sup>, Mattei M.<sup>4</sup>, Palamara A.T.<sup>2</sup>, Polonelli L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. Patologia e Medicina di Laboratorio, Sez. Microbiologia, Università Parma, <sup>2</sup>Dip. Scienze Sanità Pubblica, Università Roma "La Sapienza", <sup>3</sup>Dip. Medicina Sperimentale e <sup>4</sup>Centro Servizi Interdipartimentale STA, Università Roma "Tor Vergata"

In questo studio è stata valutata l'attività *in vitro* ed *in vivo* di un peptide killer (KP) nei confronti di virus influenzali. KP, decapeptide sintetizzato ed ingegnerizzato sulla base della sequenza di un anticorpo anti-idiotipico ricombinante in grado di mimare l'attività microbica di una tossina killer di lievito, si era precedentemente dimostrato attivo, sia *in vitro* sia *in vivo*, nei confronti di importanti microrganismi patogeni eucarioti e procarioti. KP, inoltre, ha mostrato una elevata omologia di sequenza con parte della regione variabile di un anticorpo neutralizzante l'attività fusogena della emoagglutinina (HA) del virus influenzale. Sulla base di queste osservazioni, diverse linee cellulari (LLC-MK2, MDCK e AGMK-37RC) sono state infettate con due diversi ceppi virali di Influenza A, uno aviario (Ulster 73) ed uno neurovirulento umano (NWS/33/H1N1), a diverse molteplicità di infezione (m.o.i.), con successiva aggiunta di differenti quantità di KP o di un peptide "scramble" (SP), utilizzato come controllo. KP si è dimostrato in grado di inibire la replicazione virale, in modo m.o.i.- e dose-dipendente, con un blocco completo della produzione di particelle virali a 80 µg/ml anche alla m.o.i. più elevata (20 u.f.p./cellula). Tale inibizione sembra essere dovuta ad una significativa riduzione delle molecole di HA espresse sulla membrana delle cellule infette e della loro glicosilazione, come evidenziato mediante saggi di emoadsorbimento e di marcatura pulsata con <sup>14</sup>C-mannoso, rispettivamente. Successivamente, topi Balb/c sono stati infettati per via intranasale con il ceppo neurovirulento NWS/33 (5 unità HA/topo, concentrazione dimostrata in esperimenti preliminari capace di indurre mortalità nel 90% degli animali in un periodo di 10 giorni). Dopo 30 minuti dall'infezione, i topi sono stati divisi in maniera casuale in tre gruppi, ai quali sono stati somministrati, giornalmente per 11 giorni per via intraperitoneale, KP alle dosi di 50 o 100 µg/topo o soluzione fisiologica (gruppo di controllo). Il trattamento con KP ha aumentato in maniera dose-dipendente la sopravvivenza degli animali infetti rispetto ai controlli, con una percentuale di sopravvivenza del 40 e 80%, rispettivamente, per le concentrazioni inferiore e superiore di KP utilizzate. Il 50% dei topi trattati con la dose più elevata rimaneva in vita per 45 giorni senza mostrare alcun sintomo di malattia. La valutazione del titolo virale nei polmoni, mediante determinazione della TCID<sub>50</sub>, ha evidenziato una significativa riduzione dose-dipendente di tale titolo negli animali trattati con KP. Ulteriori studi sono in corso per definire tempi e modalità di trattamento per incrementare ulteriormente l'efficacia antivirale del peptide.

## PRODUZIONE DI BIOFILM DA PARTE DI CEPPI CLINICI DI *CANDIDA* SPP. RESPONSABILI DI CANDIDEMIA

Brunella Posteraro, Marilena La Sorda, Alessandra Quarta, Barbara Fiori, Rosaria Porta, Maurizio Sanguinetti e Giovanni Fadda  
Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

La produzione di biofilm viene considerata un potenziale fattore di virulenza per alcune specie di *Candida* responsabili di fungemia catetere-correlata, soprattutto in pazienti sottoposti a nutrizione parenterale totale. Abbiamo pertanto voluto valutare se ceppi di *Candida* spp., isolati da emocolture, fossero in grado di formare biofilm quando cresciuti in terreno contenente glucosio. A tale scopo, sono stati studiati 228 ceppi di *Candida* spp. (119 *C. albicans*, 54 *C. parapsilosis*, 22 *C. tropicalis*, 22 *C. glabrata*, 7 *C. guilliermondii*, 2 *C. krusei*, 1 *C. lusitanae* e 1 *C. zeylanoides*) isolati da pazienti ricoverati presso il Policlinico Universitario "A. Gemelli" nel periodo Gennaio 2003-Dicembre 2004. Per indurre la formazione di biofilm, i microrganismi sono stati fatti crescere in micropiastre a 96 pozzetti contenuti Sabouraud Dextrose Broth ad alta concentrazione (8%) di glucosio. La produzione di biofilm è stata quindi valutata mediante spettrofotometro e i risultati sono stati espressi come percentuali di trasmittanza rispetto ad un controllo negativo. I risultati hanno evidenziato come i ceppi di *C. albicans* siano in grado di produrre significativamente meno biofilm rispetto a ceppi appartenenti a specie non-*C. albicans* (41% versus 82%;  $P < 0.05$ ). Inoltre, tra i ceppi di *C. albicans* solo 2 (4%) erano in grado di produrre alte quantità di biofilm. Al contrario, 43 ceppi (39%) di specie non-*C. albicans* producevano biofilm ad elevati livelli. Tra queste specie, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* sono risultate essere quelle maggiormente in grado di produrre biofilm ad elevati livelli (68% e 44% rispettivamente), mentre *C. glabrata* raramente (4.5%) produceva biofilm ad elevati livelli. In conclusione, i nostri dati dimostrano come ceppi di *Candida* spp. isolati dal sangue producano frequentemente biofilm e come questo fenomeno riguardi maggiormente le specie non-*C. albicans* (soprattutto *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*).

## VIBRIONI ISOLATI DAL MAR LIGURE IN FORMA LIBERA E ADESA AL PLANCTON: CARATTERISTICHE DI PATOGENICITÀ

R. Tarsi<sup>a</sup>, L. Pane<sup>b</sup>, G.L. Mariottini<sup>b</sup>, E. Debbia<sup>c</sup>, C. Pruzzo<sup>b</sup> e G.C. Schito<sup>c</sup>.

Istituto di Microbiologia e Scienze Biomediche, Università Politecnica delle Marche<sup>a</sup>, Dipartimento di Biologia<sup>b</sup> e DI.SC.A.T. Sezione di Microbiologia<sup>c</sup>, Università di Genova.

Nelle acque costiere sono presenti microorganismi indigeni, potenzialmente patogeni per l'uomo (e. g. *Vibrio* spp, *Aeromonas* spp.) la cui concentrazione non è correlabile con quella degli indicatori fecali. Lo studio delle loro caratteristiche di patogenicità costituisce la base per la comprensione del rischio reale che essi rappresentano per la salute dell'uomo e la messa a punto di protocolli adeguati per il loro rilevamento. In questo lavoro vengono presentati i risultati di un'indagine condotta per studiare le caratteristiche di patogenicità di vibrioni isolati nel Mar Ligure, sia in forma libera che adesa al plancton. In particolare, sono state studiate le capacità emoagglutinanti e l'adesività nei confronti di cellule intestinali in coltura (Caco2 e Intestine 407) di isolati appartenenti a varie specie di vibrioni e, in particolare, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* e *V. cholerae* non O1/O139. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il 17% dei ceppi non presenta caratteristiche adesive; il 21% è in grado di aderire con una efficienza variabile da 5 a 15 batteri/cellula e il 49% con una efficienza variabile da 16 a 25 batteri/cellula; il 13% dei ceppi, infine, è risultato in grado di aderire con un'efficienza pari a più di 25 batteri/cellula. È interessante osservare che i ceppi che non hanno mostrato capacità adesive appartengono alla specie *V. alginolyticus* e ad altre specie tipicamente ambientali. I ceppi più adesivi appartengono alle specie *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. alginolyticus* e presentano valori di adesione paragonabili a quelli osservati con isolati di *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* di origine clinica. Infine, tra i ceppi di *V. parahaemolyticus*, solo i due isolati con le maggiori capacità adesive sono risultati positivi in seguito ad amplificazione del DNA mediante PCR con primer per il gene della tossina TRH. Solo i ceppi di *V. parahaemolyticus* hanno mostrato capacità emoagglutinanti. Non sono state messe in evidenza differenze significative tra batteri isolati dall'acqua e dal plancton. Questi dati confermano la presenza di caratteristiche di patogenicità in ceppi autoctoni dell'ambiente acquatico e sostengono la necessità di un loro costante rilevamento nelle acque costiere.

## IL GENE *FLHF* REGOLA IL NUMERO DI FLAGELLI, IL DIFFERENZIAMENTO SWARMING E LA SECREZIONE DI PROTEINE IN *BACILLUS CEREUS*

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

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

Il flagello batterico è un'appendice filiforme di natura proteica presente sulla superficie cellulare di tutti gli eubatteri dotati di motilità *swimming*. La biogenesi del flagello richiede l'attività di più di 40 geni, la cui specifica delezione ha permesso di chiarire l'ultrastruttura, la modalità d'assemblaggio e la regolazione del movimento flagellare. Poco è noto, invece, relativamente ai meccanismi molecolari che regolano il numero e la posizione dei flagelli sulla superficie cellulare, caratteristiche specie-specifiche che possono variare nell'ambito della specie dipendendo dallo stato fisico e chimico del mezzo di crescita; è noto, infatti, che eubatteri flagellati, quando trasferiti da un substrato liquido ad uno solido, vanno incontro ad un processo di differenziamento producendo cellule altamente specializzate (cellule *swarm*) dotate di un numero di flagelli superiore a quello mostrato nel mezzo di provenienza liquido. Pochi sono i geni ai quali è stato attribuito un ruolo nella regolazione del numero e della posizione dei flagelli: nelle specie batteriche monotriche *Pseudomonas aeruginosa* e *P. putida*, i geni *fleN* ed *flhF* cooperano per mantenere il singolo flagello in posizione polare; in *Bacillus subtilis* è stato dimostrato che l'operone dicistronico *swrA* ha un ruolo nella regolazione del numero dei flagelli in liquido ed è essenziale affinché il microrganismo possa produrre cellule *swarm* in risposta al contatto con superfici solide.

Per meglio comprendere le basi genetiche che regolano numero e posizione dei flagelli nella specie peritrica *Bacillus cereus*, è stata effettuata un'approfondita analisi del genoma del ceppo ATCC 14579. Ciò ha permesso di identificare una *open reading frame* definita, per omologia con gli altri microrganismi, *flhF*. Dal ceppo ATCC 14579 è stato, pertanto, prodotto ed analizzato un ceppo mutante (MP06) in tale gene. Il ceppo MP06, comparativamente al ceppo ATCC 14579, è risultato: i) meno mobile; ii) dotato di un ridotto numero di flagelli sulla superficie cellulare (1-3 contro i 10-12 per cellula del ceppo parentale); iii) incapace di dare origine a cellule *swarm* in risposta al contatto con terreni di coltura solidi; e iv) difettivo nella secrezione di specifici fattori di virulenza (emolisina BL e fosfolipasi C specifica per la fosfatidilcolina), nonostante caratterizzato da un profilo di secrezione delle proteine totali complessivamente aumentato.

## RUOLO DI UN REGOLATORE TRASCRIZIONALE *PERR*-LIKE NELLA RISPOSTA ALLO STRESS OSSIDATIVO E NELLA VIRULENZA DI *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Maurizio Sanguinetti<sup>1</sup>, Brunella Posteraro<sup>1</sup>, Jean-Christophe Giard<sup>2</sup>, Nicolas Verneuil<sup>2</sup>, Yoann Le Breton<sup>2</sup>, Yanick Auffray<sup>2</sup>, Axel Hartke<sup>2</sup> e Giovanni Fadda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma e <sup>2</sup>Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement, EA 956, USC INRA, IRBA, Université de Caen, Francia

In questo studio, viene descritta in *Enterococcus faecalis* l'identificazione e la caratterizzazione di un gene (*efl585*) omologo a *PerR* (denominato *PerR*-like), uno dei più importanti regolatori trascrizionali coinvolti nella risposta allo stress ossidativo in *Bacillus subtilis*. Dapprima, sono stati effettuati esperimenti in cui il gene *PerR*-like è stato distrutto mediante mutagenesi inserzionale a partire dal ceppo di riferimento di *E. faecalis* JH2-2, mediante il plasmide suicida pUCB300. L'analisi fenotipica del mutante ottenuto ha mostrato che tale mutante era significativamente ( $P < 0.05$ ) più resistente al challenge ossidativo da perossido di idrogeno rispetto al ceppo wild-type JH2-2. Successivamente, per valutare l'attività regolatoria del suddetto fattore trascrizionale, è stata determinata, mediante RT-PCR quantitativa, sia nel ceppo wild-type che nel ceppo mutato l'espressione di otto geni (*sodA*, *kat*, *npr*, *ahpF*, *ahpC*, glutatione reduttasi, NADH ossidasi, tioredoxina reduttasi), potenzialmente coinvolti nella risposta allo stress ossidativo di *E. faecalis*. Sorprendentemente, l'espressione di nessuno di questi geni era influenzata dalla distruzione di *PerR*-like. Allo stesso modo, anche la sopravvivenza all'interno di macrofagi peritoneali murini non era influenzata dalla distruzione di questo locus genico. Al contrario, il ceppo delecto di *PerR*-like era significativamente meno virulento in un modello di peritonite murina rispetto al ceppo wild-type. In conclusione, i nostri risultati dimostrano come *PerR* possa essere considerato un fattore di virulenza di *E. faecalis*, ma come il suo ruolo nella regolazione trascrizionale in *E. faecalis* sia diverso da quello svolto in *B. subtilis*.

## INTERAZIONI MOLECOLARI TRA GAMMA-HERPESVIRUS SUINI E UMANI.

Santoni F., Ehlers B.\*, Caselli E., Cassai E. e Di Luca D.

*Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica, Università di Ferrara, Ferrara, \*Robert Koch-Institute, Berlin.*

La riattivazione degli herpesvirus dalla latenza è un'importante causa di patogenesi e di mortalità negli individui sottoposti a trapianto di organi umani. Questo problema può essere ulteriormente complicato in caso di xenotrapianto. Infatti, i virus che causano zoonosi possono riattivarsi e replicare nel tessuto trapiantato, ed interagire con virus umani omologhi. Poiché i suini sono considerati candidati ideali come fonte di organi per il trapianto nell'uomo, abbiamo analizzato le potenziali interazioni tra herpesvirus suini e umani. L' Herpesvirus linfotropico suino di tipo 1 (PLHV-1) è un gamma-herpesvirus omologo al virus di Epstein-Barr (EBV) e all'Herpesvirus umano di tipo 8 (HHV-8). E' presente con un'alta prevalenza nei suini domestici e selvatici ed è associato ad una patologia linfoproliferativa posttrapianto nei suini di piccola taglia. Al fine di studiare le possibili interazioni molecolari tra i suddetti gamma-herpesvirus, abbiamo clonato i principali transattivatori virali di PLHV-1 (ORF50, ORF57 e ORFA6/BZLF1) e abbiamo testato la loro capacità di attivare alcuni importanti promotori litici virali di EBV e di HHV-8. Analogamente, abbiamo testato gli effetti dei transattivatori di HHV-8 (ORF50, ORF57 e ORFK8) e di EBV (BRLF1/Rta e BZLF1/Zta) sui promotori di PLHV-1. I risultati indicano che ORF50 di PLHV-1 incrementa l'attività di tutti i promotori di HHV-8 e che ORFA6/BZLF1 di PLHV-1 attiva i promotori di EBV. Inoltre, la transfezione di ORF50 di PLHV-1 in linfociti B latentemente infettati da HHV-8 induce la riattivazione del virus umano.

In parallelo, sia ORF50 di HHV-8 che BRLF1/Rta di EBV possiedono un forte effetto transattivante sui promotori di PLHV-1. Tale effetto viene esercitato anche da ORF57 di HHV-8 e da BZLF1/Zta di EBV, anche se in misura inferiore. I dati pertanto suggeriscono che, in caso di coinfezione a seguito di xenotrapianto, è possibile che si verifichino interazioni molecolari tra herpesvirus suini e umani, potenzialmente rilevanti nel conseguente sviluppo di patologie posttrapianto.

## RUOLO DELL'INTERAZIONE GLICOPROTEINA D/RECETTORE HVEA NELL'ATTIVAZIONE PRECOCE DI NF-KB DA PARTE DI HSV-1

Sciortino M.T.<sup>1</sup>, Medici M.A.<sup>1</sup>, Marino Merlo F.<sup>1</sup>, Zaccaria D.<sup>1</sup>, Camuti A.P.<sup>1</sup>, Venuti A.<sup>1</sup>, Giofrè M. <sup>1</sup>, Grelli S.<sup>2</sup>, Mastino A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Scienze Microbiologiche, Genetiche e Molecolari, Università di Messina, Messina; <sup>2</sup>Dip. di Medicina Sperimentale e Sc.Biochimiche, Università di Roma "Tor Vergata", Roma.

Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) attiva prontamente il fattore nucleare kappa B (NF-kB) in seguito all'infezione semi-permissiva di cellule monocitoidi U937 e la glicoproteina D (gD) dell'envelope di HSV-1 è di per sé sufficiente a generare tale attivazione, come da noi precedentemente dimostrato. Inoltre, gli stessi stimoli causavano una protezione NF-kB-dipendente dall'apoptosi indotta via Fas, associata alla up-regolazione dei geni antiapoptotici. Ci siamo quindi chiesti se l'interazione di gD con il suo recettore HveA/HVEM/TNFRSF14, pienamente espresso solo in alcune cellule tra cui le cellule U937, potesse essere coinvolta nella generazione della attività di segnale utilizzata da HSV-1 per regolare la sopravvivenza cellulare nella fase precocissima dell'infezione. A tale scopo, diverse linee cellulari linfoidi, monocitoidi od epiteliali sono state controllate per l'espressione di HveA a livello di mRNA, per mezzo di rt-PCR, o a livello di membrana, mediante citometria a flusso dopo marcatura con anticorpo specifico. Sono state quindi selezionate linee francamente HveA-positive o HveA-negative per i successivi esperimenti, i cui risultati possono essere così riassunti. L'attivazione di NF-kB da parte di HSV-1 inattivato agli UV o da gD solubile era limitata alle linee HveA+ mentre era assente nelle linee HveA-. I contatti intercellulari, ottenuti mediante cocultura con trasfettanti esprimenti sulla superficie la forma naturale di gD attivavano NF-kB e proteggevano dall'apoptosi cellule HveA+, mentre i contatti ottenuti con trasfettanti esprimenti sulla superficie una forma di gD mutata, incapace di legare HveA, non erano in grado di causare gli stessi effetti. Anticorpi in grado di interferire con le interazioni gD/HveA neutralizzavano gli effetti NF-kB-dipendenti causati dalla gD solubile. Questi ed altri risultati indicano che esiste una via di segnale innescata dall'interazione gD/HveA in grado di attivare NF-kB nelle fasi precocissime dell'infezione di HSV-1 in cellule HveA+ e di generare segnali antiapoptotici. L'individuazione di tale nuova via può contribuire a chiarire le complesse interazioni HSV/cellula ospite oltre a fornire nuovi risvolti applicativi.

## ATTIVITÀ DI INIBITORI SINTETICI DI ISTONE DEACETILASI SULL'ACQUISIZIONE DI RESISTENZA AGLI AZOLICI IN *CANDIDA ALBICANS*.

Giovanna Simonetti, Claudio Passariello, Antonello Mai, Anna Teresa Palamara

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

Negli ultimi anni lo studio dei meccanismi che limitano o favoriscono l'accessibilità del DNA ai meccanismi di trascrizione, ed in particolare di quelli che regolano lo stato di acetilazione delle proteine istoniche, ha reso possibile lo sviluppo di nuove strategie per modulare farmacologicamente l'attività di cellule eucariotiche. Inibitori specifici delle istone deacetilasi (HDAC) sono stati largamente proposti come agenti antitumorali e si sono dimostrati attivi anche su HDAC fungine.

Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare in vitro, in *Candida albicans*, l'attività di diversi inibitori di HDAC, sia leading compounds [tricostatina (TSA) e suberoilamide idrossamato(SAHA)] che molecole di nuova sintesi, con struttura idrossamidica, sulla crescita, sulla sensibilità e sull'induzione di resistenza al fluconazolo e sulla formazione di tubi germinativi.

E' stato così evidenziato che l'attività di queste molecole sulla crescita di *C.albicans* è scarsa.

La valutazione dell'influenza di inibitori di HDAC sulla sensibilità di *C.albicans* al fluconazolo ha mostrato una significativa riduzione dei valori di MIC, più marcata per il TSA e per 2 degli inibitori di nuova sintesi e minore per SAHA e per gli altri inibitori di nuova sintesi.

Tutti gli inibitori studiati determinano in vitro una forte inibizione dell'induzione di resistenza al fluconazolo.

E' stato anche possibile evidenziare che inibitori di HDAC riducono significativamente la percentuale di germinazione di ceppi di *C.albicans*.

Per chiarire i meccanismi molecolari coinvolti nelle attività biologiche evidenziate sono stati condotti studi preliminari sui livelli di espressione di geni coinvolti nella resistenza agli azolici e nella virulenza di *C.albicans*, fra cui *cdr1*, *cdr2*, *mdr1*, *cap1* ed *efg*.

I dati ottenuti nel loro insieme suggeriscono che gli inibitori di HDAC possono rivestire un ruolo di rilievo per la terapia delle infezioni sistemiche da *C.albicans*. La sintesi di nuovi inibitori, specificamente sviluppati a questo scopo, potrebbe consentire di ottenere molecole con caratteristiche farmacologiche più favorevoli di quelle attualmente disponibili. A tale scopo stiamo attualmente sviluppando dei sistemi ricombinanti di espressione delle due principali HDAC di *C.albicans*, *hda1* ed *rdp3*, onde sviluppare una metodica di saggio di attività enzimatica ad elevata specificità per nuovi inibitori sintetizzati..

## ESPRESSIONE DI BRKA IN *BORDETELLA PERTUSSIS* E SENSIBILITÀ DEL BATTERIO ALL'ATTIVITÀ BATTERICIDA DI SIERI DI MALATI

Paola Stefanelli \*, Maurizio Sanguinetti§, Cecilia Fazio\*, Giovanni Fadda§, Paola Mastrantonio\*

\*Dipartimento Malattie Infettive - Istituto Superiore di Sanità - Roma

§Istituto di Microbiologia Università Cattolica del S.Cuore - Roma

La resistenza all'attività battericida del siero è un processo critico per la sopravvivenza dei batteri durante le prime fasi della risposta immune di tipo innato. BrkA (bordetella resistance killing antigen) è un importante fattore di virulenza di *Bordetella pertussis* capace di interferire con l'attività del complemento anche se esistono risultati contrastanti relativamente alla sua capacità di sopravvivere all'azione mediata dal complemento.

In questo studio abbiamo voluto saggiare la differente espressione del gene *brkA* in un pannello di ceppi di *B. pertussis* isolati da bambini con pertosse.

La Realtime RT-PCR è stata messa a punto in comparazione all'espressione del gene *recA* di *B. pertussis*. I sieri per il test di battericidia, collezionati durante il trial per la valutazione dell'efficacia dei vaccini acellulari antipertosse in Italia, sono stati utilizzati dopo inattivazione al calore e utilizzando come fonte di complemento un siero di cavia precedentemente testato.

Su un totale di 30 ceppi di *B. pertussis* analizzati, 8 esprimevano livelli superiori e 7 inferiori di espressione di BrKA rispetto al ceppo di riferimento ( $P < 0.05$ ). Questi ceppi di *B. pertussis*, definibili ad alta e a bassa espressione di BrKA, si sono dimostrati rispettivamente resistenti e sensibili all'attività battericida dei sieri esaminati nello studio.

Questi risultati suggeriscono che non tutti i ceppi di *B. pertussis* esprimono eguali livelli di BrKA e che questa variabilità nell'espressione, probabilmente risultato di regolazioni trascrizionali diverse, si riflette in diversi livelli di sensibilità alla battericidia sierica ovvero alla lisi mediata da complemento. Questi dati permetterebbero, inoltre, di ipotizzare che una diversa capacità di *B. pertussis* di resistere alla lisi mediata dal complemento sia in grado, per esempio, di influenzare la clearance del batterio nel nasofaringe nello stato di portatore.

## STUDIO SULLE MUTAZIONI DI HIV-1 ASSOCIATE A FARMACORESISTENZA NEL PLASMA E NELLE CELLULE MONONUCLEATE DI SANGUE PERIFERICO.

Turriziani O, Bellomi F, Forte G, Bucci M, Stano A, Mazzamurro A, Fimiani C, Mezzaroma I, Renda V, Vullo V, Scagnolari C, Riva E, Dianzani F, Antonelli G.

Università "La Sapienza"; Università Campus Biomedico; Policlinico Umberto I; IRCCS "L. Spallanzani", Roma

**Obiettivo:** Confrontare i profili di farmacoresistenza di HIV-1 nel plasma e nel compartimento cellulare periferico.

**Materiali e Metodi:** Lo studio è stato eseguito su 51 campioni di plasma e PBMC provenienti da soggetti HIV+ sottoposti a terapia antiretrovirale prolungata (>7 anni). Le regioni RT e PRO del gene *pol* di HIV sono state sequenziate utilizzando il protocollo "TRUGENE HIV-1" ed elaborati secondo i criteri del "GUIDE LINES<sup>TM</sup> RULE 9.0-BAYER".

**Risultati:** Confrontando i "pattern" di resistenza ottenuti analizzando il virus plasmatico e quello cellula-associato, è stato possibile osservare che nel 58.8 % esiste una concordanza di risultati.

Al contrario, nel 41.2 % dei campioni studiati il profilo di resistenza osservato per il virus plasmatico non concorda con quello ottenuto considerando il DNA provirale. L'analisi del numero di mutazioni riscontrate nel virus presente nei due distretti ha rivelato che il virus plasmatico presenta, in generale, un numero di mutazioni maggiore di quello osservato nel DNA provirale. Tuttavia il confronto tra mutazioni rilevate nella regione della RT e mutazioni presenti nella regione "pro" ha dimostrato che in circa il 50 % dei campioni il virus intracellulare integrato presenta un numero di mutazioni per RT maggiore rispetto a quello riscontrato nel virus plasmatico. Per quanto riguarda le mutazioni rilevate nella regione PRO queste sono prevalenti nel DNA provirale solo in circa il 10 % dei campioni discordanti.

**Conclusioni:** Il profilo di resistenza del virus plasmatico può non rispecchiare quello del virus intracellulare integrato. Le osservazioni riportate, se confermate su un numero più elevato di soggetti, potrebbero avere implicazioni cliniche importanti; in effetti le varianti virali farmacoresistenti associate alle cellule potrebbero influenzare la risposta ad un successivo regime terapeutico.

## DIVERSITÀ GENETICA NEL CONTENUTO DI DETERMINANTI DI VIRULENZA ASSOCIATI AD ELEMENTI PROFAGICI IN CEPPI DI *STREPTOCOCCUS PYOGENES*.

Vitali Luca Agostino, D'Ercole Stefania, Petrelli Dezemona, Manuela Prenna, Marmocchi Franco, Ripa Sandro.

Dipartimento di Biologia M.C.A., Università di Camerino, 62032, Camerino (MC).

Il sequenziamento dell'intero genoma di diversi ceppi di *Streptococcus pyogenes* ha rivelato il fondamentale contributo dato dagli elementi profagici alla diversità intraspecifica in questo importante patogeno. In particolare, i profagi, disseminati lungo tutto il genoma, sono i vettori di un numero considerevole di geni di virulenza coinvolti a diversi livelli nell'instaurarsi del processo patogenetico dello streptococco di gruppo A.

Nel presente studio sono stati analizzati il grado e le caratteristiche della variabilità dei geni di virulenza associati ad elementi profagici in 212 ceppi di *S. pyogenes*, isolati da casi di faringo-tonsillite. A tale scopo, è stata rilevata la presenza dei 14 geni di virulenza veicolati da profagi ad oggi noti. Successivamente a questa analisi è stato selezionato un sottogruppo di ceppi per i quali si è proceduto alla caratterizzazione del sito d'inserzione cromosomale dei profagi stessi. Tali dati sono stati messi in relazione al tipo *emm* caratterizzante il ceppo.

I risultati mostrano una distribuzione disomogenea dei geni di virulenza con la predominanza dei geni codificanti i fattori mitogenici MF2 e MF3, la esotossina pirogenica C, la streptodornasi e il superantigene streptococcico A. La correlazione tra geni di virulenza e tipi *emm* ha evidenziato che il numero più elevato di geni di virulenza ( $n > 4$ ) è presente nei tipi *emm* di ceppi riconosciuti come invasivi (*emm3*, *emm5*, *emm18*, *emm22* ed *emm75*). E' stata poi stilata una classificazione dei profili di presenza e localizzazione dei geni di virulenza, seguita dal calcolo delle relative frequenze nella popolazione studiata. Tali dati sono discussi in relazione ai tipi riportati in studi analoghi e ai dati provenienti dalla genomica comparativa effettuata sulle sequenze dei ceppi interamente sequenziati. I risultati ottenuti mostrano la grande variabilità in termini di contenuto in geni di virulenza e quindi il costante e consistente cambiamento del potenziale patogeno di ceppi isolati dalla faringe umana. Tale osservazione, inoltre, conferma il ben noto ruolo giocato dai batteriofago nella comparsa di nuovi determinanti genetici di virulenza e nel loro riassorbimento, con la possibile insorgenza di ceppi con un maggior potenziale invasivo.

## EFFETTI BIOLOGICI DI HIV-1 SULLA PROLIFERAZIONE E DIFFERENZIAZIONE DEI MEGACARIOCITI

Vitone F., Schiavone P., Bon I., Alessandrini F., Fabbri G., Gibellini D., Re MC.

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

Nell'evoluzione naturale dell'infezione da HIV-1, è frequente l'osservazione di citopenie periferiche, nell'ambito delle quali la trombocitopenia può rappresentare l'unica manifestazione ematologica in pazienti altrimenti asintomatici.

La trombocitopenia durante l'infezione da HIV-1 è regolata da una serie di meccanismi, come la produzione di autoanticorpi diretti contro le piastrine, l'infezione diretta dei megacariociti e la comparsa di meccanismi inibitori della proliferazione e della sopravvivenza cellulare dei progenitori ematopoietici.

Abbiamo quindi studiato gli effetti dell'infezione di HIV-1 sulla proliferazione, la sopravvivenza e il differenziamento su linee cellulari umane HEL e su cellule ematopoietiche CD34+ purificate da cordone ombelicale e indotte al differenziamento in coltura liquida verso la filiera megacariocitaria. I risultati hanno dimostrato come le cellule primarie e le cellule HEL esposte al virus presentino un alto livello di apoptosi saggiata con metodi di citometria a flusso. Inoltre, nelle cellule primarie ematopoietiche, differenziate verso la filiera megacariocitaria, è stato possibile notare una consistente riduzione della proliferazione evidenziabile specialmente a 6-12gg dall'infezione.

L'analisi dei principali marker di superficie, specifici per la filiera megacariocitaria, ha inoltre permesso di osservare una riduzione percentuale nel numero di cellule positive per questi recettori indicando una più lenta evoluzione del differenziamento. In successivi esperimenti, abbiamo analizzato gli effetti dell'interazione con HIV-1 inattivato o gp120 ricombinante ottenendo dei risultati comparabili a quelli descritti con il ceppo biologicamente attivo di HIV-1, che suggeriscono una fondamentale interazione tra HIV-1 e il recettore CD4 presente sulle cellule ematopoietiche CD34+ inibente lo sviluppo normale della megacariocitopoiesi. Abbiamo infine analizzato le variazioni di espressione di molecole della famiglia del TNF che sono coinvolte sia nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare sia nel differenziamento della filiera megacariocitaria in modo da determinare il ruolo giocato da questi fattori durante l'infezione da HIV-1 nell'indurre la trombocitopenia.

## IMMUNITÀ INNATA NELL'INFEZIONE TUBERCOLARE

Giovanna Batoni

Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia

Università di Pisa

La presente relazione si focalizzerà su vari elementi cellulari dell'immunità innata (macrofagi, cellule dendritiche, cellule NK), sottolineando il loro ruolo nell'immunità antitubercolare e le loro reciproche interazioni. Le cellule dell'immunità innata riconoscono motivi molecolari ripetuti ed altamente conservati della superficie degli agenti patogeni (PAMPs) mediante recettori di membrana chiamati PRRs (*pathogen recognition receptors*). Questi includono la famiglia dei *Toll-like receptors* (TLRs), il cui ruolo nella risposta innata a *M. tuberculosis* sta acquisendo un'importanza crescente. E' stato, infatti, dimostrato che vari componenti micobatterici, sia secreti che associati alla superficie del batterio, sono in grado di interagire con i membri della famiglia dei TLRs e mediare l'attivazione di funzioni effettrici quali l'attività battericida e la secrezione di citochine nonché la maturazione delle cellule dendritiche e l'induzione di apoptosi. La tecnologia dei microarray ha permesso di analizzare a livello globale la risposta cellulare che segue all'interazione degli agenti patogeni con i recettori delle cellule dell'immunità innata e/o la loro fagocitosi. Tali studi hanno dimostrato che sebbene *pattern* comuni di geni vengono indotti da classi diverse di microrganismi (Gram+, Gram-, micobatteri, funghi) è possibile evidenziare anche una risposta patogeno-specifica. In particolare, l'analisi della risposta *M. tuberculosis*-specifico ha rivelato una inibizione della produzione di IL-12 da parte dei macrofagi infettati, suggerendo un importante meccanismo con cui il microrganismo può evadere le difese dell'ospite. Si ritiene che macrofagi e cellule dendritiche svolgano ruoli diversi nella risposta innata contro *M. tuberculosis*. Mentre i macrofagi risultano prevalentemente coinvolti nell'attività battericida e nell'induzione della risposta granulomatosa, le cellule dendritiche sarebbero essenziali nel promuovere una risposta cellulare T di tipo Th1 in virtù della loro capacità di migrare negli organi linfoidi secondari e di produrre IL-12 in risposta a *M. tuberculosis*. Dati ottenuti nel nostro laboratorio indicano, infine, un ruolo delle cellule NK nella risposta cellulare al bacillo tubercolare, suggerendo che tali cellule possano rappresentare un ulteriore componente dell'immunità innata con importanti funzioni effettrici nella complessa relazione tra il bacillo tubercolare e l'ospite umano.

## COMPARISON OF CERVICAL CYTOLOGY WITH TWO DISTINCT MOLECULAR MARKERS OF HPV VIRAL ACTIVITY AS PREDICTORS FOR THE DEVELOPMENT OF CERVICAL NEOPLASIA

F. Broccolo<sup>1</sup>, G. Cassina<sup>1</sup>, S. Chiari,<sup>2</sup> R. Garcia Parra<sup>1,2</sup>, P. Perego<sup>3</sup>, A. Brenna<sup>3</sup>, S. Musumeci<sup>1</sup>, A. M. Careddu<sup>1</sup>, C. Mangioni,<sup>2</sup> C.E. Cocuzza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Medicine, Prevention and Biotechnology, University of Milano-Bicocca,

<sup>2</sup>Departments of Obstetrics and Gynecology and <sup>3</sup>Pathology, San Gerardo Hospital, Monza; Italy

**Introduction:** Human papillomaviruses (HPVs) play an essential part in the development of cervical cancer, particularly when infection is caused by “high risk” genotypes such as HPV 16, 18, 31, 33, and 45.

HPVs infections are common among sexually active women and they are often transient and asymptomatic. Currently, the presence of HPV viruses is monitored primarily by HPV DNA detection assays but this qualitative DNA determination cannot distinguish between persistent infection, considered to be a pre-cursor of neoplastic progression, and transient infections. Emphasis has recently been placed on establishing accurate new methods to diagnose HPV infection. Recently, two different HPV markers with different clinical implications, “viral load” (a marker of active viral replication suggestive of persistent infection) and the presence of HPV transforming transcripts (indicative of oncogenic activity) have been proposed although their clinical value have been never compared. The aim of the present study was to compare the HPVs viral load with the presence of oncogenic transcripts and correlate them to the results of conventional screening methods (cytological, colposcopic and histological findings).

**Methods:** The study was performed on a total of 143 cervical cytology samples recruited from patients attending Monza’s San Gerardo Hospital. Of these, 60 were newly diagnosed as having altered cytology (ASCUS, L-SIL, H-SIL), 12 showed normal cytology subsequent to previous ASCUS / L-SIL, 8 normal cytology following surgical treatment for previous H-SIL and 43 women with negative Pap test. All cytological findings were confirmed by either colposcopy and/or biopsy specimen; patients with discrepancies between cytological and histological findings were excluded from the study. The carcinogenic HPV types DNA quantification and the presence E6-E7 oncogenic transcripts were determined by Real-time PCR assays (TaqMan) and NASBA (Prelect HPV-Proofer; Norchip), respectively.

**Results:** The prevalence of HPV DNA and E6/E7 mRNA for the carcinogenic HPV types (16, 18, 31, 33, and 45) was respectively 22% in cases of normal cytology, 92% in HSIL as compared to 0% in normal cytology to 66% in HSIL. The association rate between the two markers was calculated by evaluating different cut off values; a higher association was showed when the cut off value selected for the viral load was  $\geq 10^3$  copy/ $10^5$  cells (0.58 Pearson’s  $\chi^2$ ), irrespective of the cytological subgroup.

In particularly, a higher association was found for genotypes 16 and 18 (0,93 and 1, respectively; Pearson’s  $\chi^2$ ) while no significant association was shown for genotype 31. Although both markers showed a significant association with cytological and histological findings, the HPV DNA quantification was found to be a more sensitive marker than the detection of E6-E7 mRNA, as shown in table 1.

**Conclusions:** A good correlation was found between the results obtained for the two different markers of HPV viral activity studied, particularly for genotypes 16 and 18. The viral load (using as cut off value  $10^3$  copy/ $10^5$  cells), however, showed a significantly better clinical correlation compared to the presence of oncogenic transcripts, especially in patients with early cervical precancerous lesions, indicating this as a useful early predictive marker for the development of cervical cancer. This probably reflects the absence of E6/E7 expression in exfoliating epithelial cells in patients with early precancerous lesions.

Table 1. Comparison of the cytological and histological findings with the HPV viral load and the detection of E6/E7 oncogenic transcripts

Cytology and histology results (Patients No.)	Patients No. positive for one or more genotype (%)	
	HPV viral load by TaqMan assay (No. of HPV genome Equivalent/ $10^5$ cells)	Detection of HPV E6/E7 oncogenic transcripts by NASBA
	Cut-off: $>10^3$ copy	
ASCUS/LSIL (29)	15 (52)	9 (31)
H-SIL (31)	24 (77)	21 (68)
Normal:		
Previously ASCUS/L-SIL (12)	3(25)	2 (17)
after conisation (8)	4 (50)	3 (38)
Normal (43)		
	3 (7)	0 (0)

## SISTEMI POLIMERICI INNOVATIVI PER LO SVILUPPO DI NUOVI VACCINI ANTIVIRALI

A. Castaldello<sup>1</sup>, E. Brocca-Cofano<sup>1</sup>, R. Voltan<sup>2</sup>, C. Triulzi<sup>2</sup>, M. Laus<sup>3</sup>, K. Sparnacci<sup>3</sup>, L. Tondelli<sup>4</sup>, B. Ensoli<sup>5</sup>, A. Caputo<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dipartimento Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Padova, Padova; <sup>2</sup>Dipartimento Medicina Sperimentale e Diagnostica, Università degli Studi di Ferrara, Ferrara; <sup>3</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Avanzate, Università degli Studi del Piemonte Orientale, Alessandria; <sup>4</sup>Istituto ISOF, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bologna; <sup>5</sup>Laboratorio di Virologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'uso di vettori sintetici per veicolare DNA, proteine e/o parti di essi, è un campo di ricerca in espansione in quanto tali vettori sono versatili, sicuri, e aumentano la stabilità del vaccino. Vettori sintetici basati su polimeri biocompatibili proteggono le molecole veicolate dalla degradazione enzimatica. Essi, inoltre, possono essere sintetizzati in modo da veicolare tali molecole nel sito desiderato e da rilasciarle in maniera controllata e per il tempo desiderato. I sistemi di delivery particolari dirigono efficientemente l'antigene alle cellule presentanti l'antigene, aumentando la presentazione antigenica sulle molecole MHC di classe I e II, e inducendo ampie risposte immuni, cellulari e umorali. Infine, il rilascio lento e controllato dell'antigene da parte dei sistemi particolari può consentire l'uso di basse dosi di antigene e ridurre il numero dei richiami richiesti per il successo di molte vaccinazioni. Infine, a differenza di vettori batterici o virali, i vettori sintetici sono poco immunogenici, economici e semplici da produrre, da conservare e da trasportare, e quindi facilmente disponibili anche per l'uso nei paesi in via di sviluppo. Sulla base di queste osservazioni e considerazioni generali, sono stati prodotti da questo gruppo di ricerca nuovi vettori polimerici biocompatibili per veicolare DNA e/o proteine a scopo vaccinale, e saggiati *in vitro* ed *in vivo* per la loro sicurezza, immunogenicità ed efficacia utilizzando Tat di HIV che rappresenta un antigene vaccinale rilevante per lo sviluppo di un vaccino contro l'infezione da HIV e l'AIDS.

## LA BIOLOGIA MOLECOLARE NELLA MODERNA DIAGNOSTICA CLINICA

Paola Cattani  
Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

La microbiologia clinica è una disciplina che classicamente si basa sull'isolamento e l'identificazione dei microrganismi patogeni, sebbene nelle ultime decadi, diverse nuove metodiche diagnostiche siano state introdotte nella pratica di laboratorio.

La biologia molecolare, in particolare, ha rivelato grandi potenzialità, contribuendo all'evoluzione della diagnostica microbiologica, con indubbi vantaggi anche nel monitoraggio delle infezioni in pazienti "a rischio" e/o in terapia, nel controllo delle infezioni e negli studi epidemiologici.

Nonostante alcune difficoltà, tali nuove metodiche molecolari stanno diventando sempre più diffuse, soprattutto in laboratori specializzati e nei centri di referenza.

La più comune applicazione di tali metodiche è la ricerca e l'identificazione mediante determinazione degli acidi nucleici (DNA e RNA) di microrganismi per i quali gli esami tradizionali risultano poco efficaci. Ci si avvale essenzialmente di tecniche basate sull'ibridizzazione e/o l'amplificazione di acidi nucleici e variamente applicate.

Sebbene l'utilizzazione di sonde nucleotidiche marcate costituisca un valido strumento per la ricerca diretta, l'introduzione della più sensibile reazione di amplificazione genica (PCR) ha offerto grandi opportunità, permettendo di svelare, con altrettanta specificità, agenti patogeni presenti in quantità minime o in campioni estremamente scarsi.

Considerando la grande flessibilità e relativa facilità di esecuzione, la PCR è al momento la metodica molecolare più largamente utilizzata, amplificando sia regioni geniche specifiche sia regioni conservate per indagini a più ampio spettro.

Una più recente applicazione della reazione di amplificazione è la Real-time PCR che permette analisi quantitative con grandi vantaggi in termini di tempo, specificità e accuratezza. La ricerca quantitativa di trascritti (mRNA) genici, per esempio, è un ulteriore strumento per lo studio delle interazioni microrganismo-ospite, permettendo per alcune infezioni un nuovo approccio diagnostico e prognostico.

Metodiche molecolari, come amplificazione e sequenziamento genico, hanno permesso, per esempio, l'identificazione di diversi nuovi microrganismi. Inoltre, si sono rivelate particolarmente utili per lo studio delle resistenze ai farmaci antimicrobici, applicabili per la contemporanea ricerca del patogeno e la caratterizzazione della resistenza. L'automazione e la realizzazione di DNA chips con alta densità di sonde oligonucleotidiche, infine, ha aperto nuovi orizzonti per l'identificazione e la caratterizzazione di microrganismi patogeni.

## STRATEGIE DI VENTILAZIONE E MANAGEMENT DELLO SHOCK SETTICO IN ARDS INDOTTO DALLA POLMONITE

Servillo G., Sorrentino V., Della Cioppa N., Battista B., Tufano R..

*Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Anestesiologiche-Rianimatorie e dell'Emergenza.*

*Università degli Studi di Napoli Federico II*

La terapia dell'ARDS ha sempre rappresentato una sfida per l'anestesista rianimatore, che ne ha indirizzato la scelta verso due differenti strategie: una ventilatoria e l'altra farmacologica

Gli studi randomizzati (1) hanno dimostrato che l'utilizzo di una ipoventilazione controllata, effettuata con bassi volumi correnti ed elevata frequenza respiratoria, supportati dall'erogazione di una PEEP adeguata e da manovre di reclutamento, diminuisce la mortalità.

La terapia farmacologica si è concentrata su sostanze quali l'ossido nitrico (NO), il surfactante ed i glucocorticoidi.

L'NO è un potente vasodilatatore polmonare che, somministrato per inalazione, provoca vasodilatazione polmonare selettiva e miglioramento dell'ossigenazione. Gli studi randomizzati hanno però dimostrato un effetto transitorio e limitato alle prime 48 ore, inoltre non si è avuto alcun beneficio in termini di mortalità (2).

L'utilizzo del surfactante origina dalle constatazioni che nel neonato affetto da stress severo ed in cui vi è certamente un deficit di surfactant la sua somministrazione ha mostrato un miglioramento del rapporto PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>.

I glucocorticoidi intervengono bloccando la produzione di citochine e regolando il meccanismo dell'infiammazione. La loro precoce somministrazione si è dimostrata efficace nel migliorare l'ossigenazione e l'outcome (3).

### Bibliografia

The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000;342:1301-8.

Rossaint R et Al. Inhaled Nitric Oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1993;328:399-405.

Confalonieri M, Meduri U et Al. Hydrocortisone infusion for severe community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:242-8.

## ENTEROVIRUS-INDUCED MYOCARDITIS: VIRUS DETECTION BY GENE AMPLIFICATION AND IMMUNOSTAINING OF HEART TISSUE

Camilla BERNASCONI<sup>1</sup>, Andreina BAJ<sup>2</sup>, Cinzia MAISANO<sup>3</sup>, Mario CAMOZZI<sup>3</sup>, Antonio TONIOLO<sup>2</sup>

*<sup>1</sup>European Commission, Joint Research Center, IES, Ispra (VA), Italy; <sup>2</sup>Laboratory of Medical Microbiology, University of Insubria, Varese, Italy; <sup>3</sup>Anatomia Patologica, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano, Italy.*

Viral infections of the heart are important causes of morbidity and mortality. Idiopathic dilated cardiomyopathy (DCM) may represent a late sequela of acute and chronic myocarditis either due to virus persistence or to virus-associated immune responses. Group B coxsackieviruses are one of the most common causes (25-40%) of pediatric acute myocarditis and DMC. Molecular and histopathological methods were used to detect viral agents associated with myocarditis and DMC.

The cardiac pathology archive of the Niguarda Hospital was reviewed for lethal cases of myocarditis. Twelve cases were identified in which serological and cell culture methods were unable to detect infectious agents. The inflammatory infiltrate was characterized in paraffin-embedded sections stained with monoclonal antibodies reactive with lymphoid cell surface markers.

Total RNA was extracted from formalin-fixed paraffin embedded specimens and its quality was tested by amplifying human housekeeping genes. Due to the fragmentation of nucleic acids in formalin-fixed samples, primers producing amplicons shorter than 300 bp were utilized. Samples were analyzed for detecting agents belonging to the following groups: adenovirus, varicella-zoster virus, cytomegalovirus, parvovirus B19, influenza A, enterovirus. Enterovirus-positive cases were further investigated by immunostaining with virus-specific antibodies.

PVB19 DNA was detected in 25% of cases. An increased prevalence of this agent has been already documented in acute myocarditis. One patient was positive for both PVB19 and CMV. The fatal outcome of this patient suggested a link between the severity of cardiac disease and multiviral infection. CMV genome was detected in 5/12 patients. VZV, AV and IAV were not detected. Enteroviral RNA was detected in 2/12 patients: a woman who died of giant cells necrotizing myocarditis and a boy with drug-related myocarditis. Positive cases stained intensely with mAbs directed to common enteroviral motifs of the VP1 protein. Viral antigens accumulated in the cytoplasmic area of almost all myocardial fibers. Retrospective analysis of archival tissue will enable to correlate molecular findings with the clinical outcome. These findings will also guide prospective studies intended to ascertain the environmental origin of cardiac disease.

## DETECTION OF WATERBORNE ENTEROVIRUSES BY MOLECULAR METHODS

Camilla BERNASCONI<sup>1</sup>, Andrea BIASOLI<sup>1</sup>, Antonio TONIOLO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>European Commission, Joint Research Center, IES, Ispra (VA), Italy; <sup>2</sup>Laboratory of Medical Microbiology, University of Insubria, Varese, Italy

Reduction of child mortality and the halving of peoples not having access to safe water are two of the United Nations Millennium Development Goals. The goals are ambitious, considering that 80% of global diseases are associated with water pollution and that every day 25,000 peoples, most children under five, die from waterborne diseases. Large numbers of viruses are excreted in human feces and may cause infection even if present at low concentrations. In almost all EU countries virus-associated outbreaks have been reported, though drinking water and/or shellfish were meeting current legislation standards. The evidence is increasing that poor correlation exists between the presence of animal viruses and bacteriological parameters that are mandated to assess water quality in the EU Water Directive.

The gold standard in water virology is represented by tissue culture methods that evaluate the development of CPE in cultured cells. In spite of this, many enteric viruses are poorly or not at all cultivable. Some of them (e.g., Noroviruses, HEV) can only be studied by molecular methods. We have investigated concentrated water samples for the presence of human enteroviruses. Enterovirus detection is a not mandatory parameter of the EU Bathing Water Directive.

This study was initiated to develop RT-PCR methods for detecting enteroviruses in water samples that had been pre-treated using affordable concentration methods. Inlet and outlet water samples were collected from wastewater treatment plants (WWTP) located in the geographic area of Varese. Samples were concentrated approximately 1,000-fold. Twelve of 12 inlet samples proved positive for enteroviruses using an RT-PCR method specific for the conserved 5'UTR. Eight out of 12 outlet samples were also positive. cDNA amplicons were cloned into *E. coli* TOP10F' and directly sequenced. Sequence analysis allowed to identify the following enteroviral types: CBV-4, CBV-6, CAV-16, EV-71. This finding addresses the widespread presence of important human pathogens in environmental waters and the need of more effective means for virus inactivation/removal in WWTPS.

## POLIOVIRUS INFECTION OF PRNP-KNOCKOUT MOUSE NEURONAL CELLS

Andreina BAJI<sup>1</sup>, Alessia BETTACCINI<sup>1</sup>, Takashi ONODERA<sup>2</sup>, Antonio TONIOLO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Medical Microbiology, University of Insubria, Varese, Italy

<sup>2</sup>Department of Molecular Immunology, University of Tokyo, Japan

Mice are susceptible to poliovirus infection by parenteral routes. Since expression of the prion protein gene (*Prnp*) into *Prnp*-knockout mouse cells has been shown to reduce the replication of group B coxsackieviruses, we tested whether expression of this gene could influence the susceptibility to poliovirus of neuronal mouse cells. Wild type and *Prnp*-knockout cell lines were obtained from congenic mice of C57BL/6 background: *Prnp*<sup>+/+</sup> Hw3.5 cells, *Prnp*<sup>-/-</sup> HpL3.4 cells, HpL3.4 cells transfected with *Prnp* or with constructs bearing different *Prnp* deletions. Poliovirus-1 (PV-1, Chat vaccine strain) was used for infection. Viral replication was investigated as follows: titration of infectious virus, measurement of PV-1 genomes by RT-PCR, viral antigen detection by immunofluorescence. The investigated neuronal cell lines express the murine homologue (Tage4) of human poliovirus receptor (CD155/hPVR). PV-1 infection of *Prnp*<sup>-/-</sup> HpL3.4 cells resulted in the production of high viral titers, though only 1-3% of cells expressed viral antigens. *Prnp*<sup>+/+</sup> cells were not permissive for PV-1. HpL3.4 cells transfected with the *Prnp* gene were also not permissive. HpL3.4 cells carrying deleted forms of the *Prnp* gene affecting the octapeptide repeat (OR; aa 51-90) or the hydrophobic region (HR; aa 112-145) were as permissive as *Prnp*<sup>-/-</sup> cells. Both OR and HR are essential for the anti-apoptotic and anti-oxidative activity of PrP<sup>C</sup>. HpL3.4 cells carrying a *Prnp* deletion in a biologically not relevant region of HR (aa 124-146) were less permissive to PV-1 than HpL3.4 cells. Exposure to PV-1 had no influence on the gene expression profile of *Prnp*<sup>+/+</sup> cells. In contrast, PV-1 infection of permissive *Prnp*<sup>-/-</sup> cell cultures was associated with up-regulation of several genes: type I IFN genes, IFNRD1, TNFSF13b, IL7, granulocyte/macrophage CSFs, HGF, VEGF-A, TGFb1 and b3, as well as a variety of bone morphogenetic proteins endowed with neuroprotective activity. Distinction of permissive from non-permissive neuronal cells on the basis of *Prnp* expression suggests that this protein may affect virus receptor activity and that prion-deficient mice may represent a sensitive animal model for poliovirus infection.

## DETECTION OF ABNORMAL PRION PROTEINS IN TRANSMISSIBLE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHIES BY NOVEL MONOCLONAL ANTIBODIES

Antonio TONIOLO<sup>1</sup>, Andreina BAJ<sup>1</sup>, Gianluigi ZANUSSO<sup>2</sup>, Cristina CASALONE<sup>3</sup>, Tomoko HOSOKAWA<sup>4</sup>, Kotaro TUCHIYA<sup>4</sup>, Takashi ONODERA<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical and Biological Sciences, University of Insubria, Varese, Italy

<sup>2</sup>Department of Neurological Sciences, University of Verona, Italy

<sup>3</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Torino, Italy

<sup>4</sup>Nihon Institute for Biological Science, Tokyo, Japan

<sup>5</sup>Department of Molecular Immunology, University of Tokyo, Japan

By immunizing *Prnp*-knockout mice with synthetic polypeptides, a panel of mAbs directed to bovine PrP<sup>C</sup> has been obtained. Linear epitope mapping was performed by ELISA. Three mAbs recognized linear epitopes and three mAbs recognized conformational epitopes of the bovine prion protein. The reactivity of mAbs with the normal form of PrP (PrP<sup>C</sup>) has been studied by immunofluorescence on mouse neuronal cell lines. Granular cytoplasmic fluorescence was produced by the majority of mAbs. The 1D12 antibody labeled nuclear forms of PrP<sup>C</sup>. The ability of these novel mAbs to detect abnormal prion proteins (PrP<sup>res</sup>) was investigated by immunoblotting and immunohistochemistry in scrapie, BSE, and CJD cases. All mAbs recognized PrP<sup>res</sup> isoforms in prion-infected brain tissue of mice, sheeps, cows, and humans. Among conformational antibodies, T2 and 6C4 reacted differently with kuru-type spherical plaques in the cerebellum of a type-2 CJD case (codon 129 Met/Val genotype). While 6C4 labeled the inner structure of Kuru plaques, T2 clearly identified the peripheral plaque layer. Both mAbs produced synaptic type staining in brain tissue from a type-1 CJD case. In BSE-affected brains, diffuse PrP staining of the neuropile was produced by both T2 and 6C4. The ability of different mAbs to produce distinct staining patterns in prion-infected tissues indicates that conversion from PrP<sup>C</sup> to PrP<sup>res</sup> does involve multiple steps.

## TREND EPIDEMIOLOGICI E DIFFUSIONE DI *S. PNEUMONIAE*

Annalisa Pantosti

Dipartimento MIPI, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Lo studio dell'epidemiologia delle infezioni da *S. pneumoniae* è particolarmente importante in questi anni, sia per sorvegliare l'andamento dell'antibiotico-resistenza, sia per valutare l'impatto della vaccinazione pediatrica con il vaccino 7-valente glicoconiugato. Il pneumococco è innanzitutto un colonizzatore della mucosa naso-faringea, soprattutto nella prima infanzia; come patogeno, causa un ampio spettro di infezioni, soprattutto del tratto respiratorio e sistemiche. Queste ultime, che comprendono polmonite batteriemicca, meningite e sepsi primaria, sono le manifestazioni più gravi e rappresentano il target dei vaccini antipneumococcici. I vaccini disponibili sono basati su polisaccaridi capsulari e conferiscono immunità ad un numero limitato di sierotipi. Pertanto la conoscenza dei sierotipi che causano infezioni invasive in una determinata area geografica od in una determinata popolazione è indispensabile per valutare l'impatto della vaccinazione, sia come efficacia, che come effetti complementari, quali l' "herd immunity" o il rimpiazzo dei sierotipi che colonizzano il faringe. Attualmente nella popolazione generale in Italia i sierotipi più comuni nelle infezioni invasive sono, in ordine di frequenza: 14, 19A/F, 3, 6A/B e 23F. Alcune differenze sono evidenti a seconda delle classi di età: ad esempio nei bambini ≤5 anni il sierotipo 14 rappresenta più di 1/3 di tutti i ceppi isolati, mentre nei soggetti ≥ 65 anni il sierotipo 3 è il secondo più frequente. Lo studio epidemiologico è reso più complesso dal fatto che all'interno dei sierotipi possono esistere diversi gruppi genetici o "cloni", alcuni dei quali sono dotati di caratteristiche di virulenza o di antibiotico-resistenza tali da renderli particolarmente adatti alla diffusione. Inoltre all'interno dello stesso clone possono coesistere ceppi di diverso sierotipo, grazie ad uno scambio ("switch") di geni del locus capsulare. Per avere un quadro completo della circolazione dei ceppi di *S. pneumoniae* è necessario utilizzare anche strumenti di tipizzazione genotipica, quali la Multilocus Sequence Typing. Mediante questa tecnica è stato possibile stabilire che in Italia sono diffusi alcuni cloni cosiddetti internazionali, che cioè circolano in diversi paesi e continenti, quali Spain<sup>23F-1</sup>, Spain<sup>9V-3</sup>, e Sweden<sup>15A-25</sup>, tutti resistenti alla penicillina nonché i cloni England<sup>14-9</sup> e Greece<sup>6B-22</sup>, sensibili alla penicillina ma resistenti ai macrolidi. Sono presenti anche cloni apparentemente autoctoni, quali il clone 24F che ha causato alcuni casi di meningite a Napoli e che è stato recentemente isolato anche in Portogallo.

## EFFETTO DELL'OSSIGENO IPERBARICO SUI BATTERI CHE CAUSANO LA MALATTIA PARODONTALE

Franco Bianchi, Caterina Signoretto, Gloria Burlacchini e Pietro Canepari

Dipartimento di Patologia, sezione di Microbiologia, facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Verona.

Dall'analisi della letteratura emerge chiaramente che l'insorgenza e la progressione della malattia parodontale è da attribuirsi ad elevate quantità di batteri patogeni, soprattutto anaerobi che albergano il cavo orale. Pertanto, la necessità di eliminare i batteri parodontopatogeni al fine terapeutico (o preventivo) della malattia parodontale, utilizzando approcci diversificati da quelli classici (chirurgici e non) meritano particolare attenzione in quanto potrebbero mettere a disposizione del clinico valide alternative (o da applicare in associazione) agli approcci tradizionali. Questi variano dal trattamento chirurgico, al rigenerativo, all'uso di chemioterapici anti-infettivi. Da tempo è stato dimostrato *in vitro* l'effetto inibente dell'ossigeno, non solo nei confronti dei batteri anaerobi, ma anche di quelli aerobi, dei miceti dei protozoi e dei virus. In questo studio si è cercato di valutare l'efficacia dell'azione dell'ossigeno iperbarico nella cura della malattia parodontale. Allo scopo sono stati selezionati 20 pazienti affetti da parodontopatia; in ogni paziente la cavità orale è stata suddivisa in due porzioni, lato destro e lato sinistro. Una metà della cavità orale di ogni paziente non è stata sottoposta ad alcun trattamento, mentre l'altra metà è stata sottoposta a tradizionale trattamento chirurgico-odontoiatrico (scaling). Dieci di questi pazienti sono stati quindi invitati a sottoporsi ad un ciclo di ossigeno-terapia della durata di 10 sedute, in camera iperbarica. Si sono pertanto creati 4 tipi di casi-pazienti: (i) pazienti con parodontite non trattata, (ii) pazienti con parodontite trattata chirurgicamente, (iii) pazienti con parodontite trattata solo con ossigeno iperbarico, (iv) pazienti con parodontite trattata sia chirurgicamente che con ossigeno iperbarico. Nei vari casi-pazienti, è stata effettuata una ricerca, mediante metodo colturale e con biologia molecolare, di alcuni importanti parodontopatogeni. I dati finora ottenuti sono assai incoraggianti in quanto indicano che l'effetto della terapia chirurgica viene decisamente potenziata dall'associazione con il trattamento di ossigeno-iperbarico terapia. Infatti in questi casi-pazienti il valore dei batteri parodontopatogeni risulta essere significativamente diminuito se comparato con tutti gli altri casi-pazienti.

## USO DELLA RAPD NELL'ANALISI DI CLUSTERS DI LIEVITI ISOLATI DA PAZIENTI RICOVERATI IN UTIN

Carcò D., Trovato L., Greco A.M., Oliveri S., Nicoletti G.

Azienda Ospedaliero Universitaria Policlinico di Catania

Dipartimento di Scienze Microbiologiche e Scienze Ginecologiche Università di Catania

L'uso di metodiche di biologia molecolare per l'analisi della variabilità genetica tra i ceppi di lieviti isolati da pazienti e da personale ospedaliero, ha consentito la dimostrazione della trasmissione orizzontale degli stessi. Con queste tecniche è anche possibile riscontrare l'origine endogena di alcune infezioni causate da specie del genere *Candida*. Tra le metodiche molecolari la RAPD, è stata quella da noi scelta per la sua semplicità operativa, sensibilità e specificità, per l'analisi intra- e inter-specifica su 18 ceppi di lieviti del genere *Candida*, isolati serialmente da diversi campioni biologici prelevati da 5 pazienti ricoverati in UTIN.

Sono stati selezionati 5 clusters di ceppi da pazienti ricoverati nel periodo novembre 2004 – febbraio 2005 presso l'UTIN dell'AOU Policlinico di Catania. **Cluster A:** 3 ceppi *C. albicans* (2 da campioni di feci, 1 da emocoltura); **cluster B:** 3 ceppi *C. albicans* (2 da feci, 1 da CVC); **cluster C:** 3 ceppi da feci (1 *C. albicans*, 2 *C. parapsilosis*) in paziente con antigene positivo per *Candida*; **cluster D:** 5 ceppi *C. albicans* (3 da feci e 2 da tampone faringeo); **cluster E:** 4 ceppi da feci (3 *C. albicans* e 1 *C. parapsilosis*). Il DNA è stato estratto utilizzando il protocollo e il kit della Quiagen (Germany). L'amplificazione è stata effettuata mediante l'utilizzo di 3 primer differenti:

OPE-04(5'GTGACATGCC-3'); OPA-18(5'AGCTGACCGT3');

ERIC2(5'GTAAGTGACTGGGGTGAGCG3'). Tutti i campioni sono stati amplificati e separati elettroforeticamente due volte per verificare la riproducibilità dei risultati.

Tutti i patterns RAPD dei ceppi di *C. albicans* e di *C. parapsilosis* sono compatibili con i profili dei ceppi di riferimento ATCC rispettivamente 2921 e 22019. Nei due casi di candidosi sistemica certa, cluster A e B, sono stati ottenuti profili simili tra i ceppi isoalti dalle feci ed i ceppi isolati dal sangue e da CVC. Anche nel cluster C si osservano profili simili nei due ceppi di *C. parapsilosis*. Nel cluster D vengono evidenziati tre profili polimorfici, uno per i due ceppi isolati da tampone orofaringeo, uno per due dei tre ceppi isolati da feci, e il terzo per il restante ceppo. Ciò potrebbe indicare una colonizzazione da parte di più cloni di *C. albicans*. Infine anche nel cluster E con il primer OPA18 si evidenziano tre profili diversi per i tre ceppi di *C. albicans* isolati dal paziente. L'OPA 18 nel nostro studio si dimostra quello maggiormente discriminante.

## STUDIO SULLA SENSIBILITÀ *IN VITRO* VERSO ALCUNI ANTIBIOTICI DI CEPPI DI *BORRELIA BURGDORFERI* s.l.

Santino I.<sup>1</sup>, Scazzocchio F.<sup>1</sup>, Ciceroni L.<sup>2</sup>, Ciarrocchi S.<sup>2</sup>, del Piano M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, Università "La Sapienza", Roma;

<sup>2</sup>Dipartimento Malattie Infettive Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La borreliosi di Lyme è attualmente la più comune antropozoonosi trasmessa da zecche in USA, Europa ed Asia. L'agente eziologico della malattia è la *Borrelia burgdorferi* trasmessa dalle zecche appartenenti al genere *Ixodes*. E' una infezione multisistemica che coinvolge cute, articolazioni, SNC e cuore e che si presenta classicamente in tre stadi evolutivi.

La terapia si avvale del trattamento antibiotico sia nelle fasi precoci, sia nelle fasi tardive della malattia.

Studi effettuati sia in vivo sia in vitro hanno dimostrato che *B. burgdorferi* è sensibile a penicilline, macrolidi, cefalosporine e tetracicline sebbene, il trattamento antibiotico, non sempre appare in grado di portare alla guarigione come dimostrato dalla persistenza in alcuni pazienti di segni e sintomi clinici dopo la terapia. Questo probabilmente è dovuto a vari fattori quali la capacità della spirocheta di localizzarsi a livello intracellulare e la capacità di localizzarsi in siti dell'organismo dove gli antibiotici arrivano in concentrazioni al di sotto della MIC.

Inoltre non è stato accertato se le variabilità siano dovute a selezione di mutanti o ad una pre-esposizione agli antibiotici.

Scopo del presente lavoro è stato quello di:

- determinare la sensibilità in vitro di differenti ceppi di *B. burgdorferi* verso alcune classi di antibiotici comunemente usati in terapia;
- studiare gli effetti di concentrazioni sub-inibenti di antibiotico in ceppi di *B. burgdorferi* al fine di individuare un meccanismo di resistenza legato alla preesposizione del farmaco.

Sono stati esaminati 18 ceppi di *B. burgdorferi* s.l., isolati da pazienti e da zecche, verso macrolidi,  $\beta$ -lattamici e la tetraciclina. Le borreliae sono state coltivate e saggiate in condizione normale di crescita e dopo esposizione a concentrazioni sub-inibenti degli antibiotici in esame.

I risultati ottenuti hanno evidenziato una buona sensibilità ai diversi antibiotici usati sia per gli isolati clinici, sia per gli isolati da zecca. Nelle condizioni di pre-esposizione le borreliae hanno invece mostrato un aumento dei valori di MIC rispetto al ceppo wild-type, con MIC<sub>90</sub> più elevate anche fino a 10 volte i valori iniziali. Questo innalzamento nei valori di minima concentrazione inibente in seguito a preesposizione, può spiegare almeno in parte gli insuccessi terapeutici e la mancanza di correlazione, più volte riportata in letteratura, tra i risultati ottenuti in vivo ed in vitro.

## RETROVIRUS E CANCEROGENESI

Maria Carla Re

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

Le prime evidenze sperimentali su una possibile associazione tra infezione virale e cancerogenesi compaiono all'inizio di XX secolo con la scoperta del sarcoma di Rous e solo in seguito, con la scoperta della trascrittasi inversa, i retrovirus, a causa del loro peculiare ciclo di replicazione e delle patologie correlate, sono stati oggetto di studi approfonditi che hanno permesso di chiarire, almeno in parte, sia i rapporti virus-ospite, sia la loro evoluzione molecolare.

Oltre al virus dell'immunodeficienza acquisita (HIV-1 e 2) definibile come un "fast evolving retrovirus" caratterizzato da un tasso di variabilità estremamente elevata e che ha visto la sua diffusione esplosiva negli ultimi decenni, l'attenzione di molti ricercatori si è focalizzata su HTLV-1 e 2, le cui tracce di infezione si ritrovano in individui vissuti centinaia di anni fa e il cui genoma "stabile" ha permesso di essere utilizzato come marker molecolare per individuare e tracciare i fenomeni migratori di popolazioni vissute in tempi remoti.

Come è noto, ai retrovirus appartengono numerosi virus oncogeni (oncovirus) in grado di produrre diversi tipi di tumori in varie specie animali e almeno in un caso rappresentato dal virus della leucemia umana a cellule T (HTLV-1) correlato alla comparsa di una patologia tumorale umana [leucemia a cellule T dell'adulto (ATL)]. I caratteri di endemicità di HTLV-1 in alcune popolazioni che vivono in aree remote del globo suggeriscono la presenza di questo virus da parecchie centinaia di anni.

Il rischio di potere sviluppare l'ATL per un soggetto HTLV-1 infetto si aggira intorno allo 0.1% con un lungo periodo di latenza (circa 20 anni). I pazienti, da un punto di vista clinico presentano linfonodi ingrossati, epatosplenomegalia, lesioni della cute e lesioni a livello dell'osso, dovute alla presenza di cellule leucemiche infiltranti e a ipercalcemia

Oltre ad HTLV-1, un altro retrovirus denominato HTLV-2 fu isolato negli anni '80, ma il suo ruolo patogenetico rimane ancora oggetto di discussione. La maggior parte dei soggetti HTLV-2 infetti sono asintomatici durante tutta la vita. Recentemente l'infezione è stata associata anche con disordini neurologici e con una aumentata prevalenza di altre malattie infettive. Numerosi studi si sono recentemente focalizzati sui meccanismi patogenetici di HTLV-2 e in particolare sul ruolo del virus nel mediare la sopravvivenza e la crescita dei precursori ematopoietici.

I meccanismi alla base della lenta evoluzione (peculiare ciclo replicativo, tassi di mutazione relativamente contenuti e propagazione del virus nell'ospite), insieme alla presenza di diversi sottotipi oggi identificati e agli ultimi dati di letteratura riguardanti HTLV-3 e HTLV-4, saranno approfonditi insieme alle affascinanti ipotesi sull'origine di questi virus.

## LA CHLAMYDIA PNEUMONIAE E LE MALATTIE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

Prof. M. del Piano

Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, Università "La Sapienza" - Roma

La *Chlamydia pneumoniae*, batterio patogeno intracellulare obbligato responsabile delle malattie respiratorie, è un microrganismo che ha destato l'interesse di moltissimi studiosi che hanno focalizzato la loro attenzione sui suoi meccanismi patogenetici, sulla biologia molecolare, sulle possibili correlazioni con un numero sempre più crescente di malattie tra le quali non ultime le malattie del Sistema Nervoso Centrale (SNC) quali ad es. la sclerosi multipla, lo stroke, l'Alzheimer, l'arterite temporale, gli aneurismi cerebrali e le encefalomieliti.

Numerosi sono gli studi che tendono ad affermare tali correlazioni sulla base essenzialmente dei risultati di tre linee di ricerca: la possibilità dei meccanismi patogenetici della *C. pneumoniae* di ricalcare i meccanismi patogenetici di ciascuna delle differenti malattie del SNC;

la messa in evidenza degli anticorpi anti-*C. pneumoniae* o del DNA di *C. pneumoniae* nell'organismo di questi pazienti.

la riproduzione in vitro e/o in vivo di effetti patogenetici, indotti dalla *C. pneumoniae*, simili a quelli delle malattie riscontrati negli individui malati.

D'altra parte altrettanto numerosi sono quegli studi che non hanno riscontrato tale correlazione.

Una valutazione attendibile e definitiva dei risultati ottenuti fino ad oggi è da considerarsi con molta attenzione e senso critico dipendenti come essi sono da metodologie non standardizzate per cui appare, al momento attuale, ancora difficile tracciare linee certe di valutazione che permettano di valutare senza dubbi l'effettiva importanza della *C. pneumoniae* in queste malattie.

## IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI VIRUS RESPIRATORI

Alberta Azzi

Dipartimento di Sanità Pubblica, Università degli Studi di Firenze

Le infezioni respiratorie virali sono causate da numerosi virus appartenenti a Famiglie diverse. Possono interessare sia le vie aeree superiori che colpire anche le basse vie respiratorie, con patologie che vanno quindi dal raffreddore comune a bronchiti, bronchioliti e polmoniti. Negli ultimi anni sono emersi diversi "nuovi" virus respiratori, tra i quali, ad esempio, il metapneumovirus umano e alcuni coronavirus, ad arricchire il già complesso quadro eziologico delle malattie respiratorie virali. In alcuni casi, si sta delineando anche il ruolo eziopatogenetico di alcune coinfezioni virali. Inoltre, in non pochi casi le malattie respiratorie virali restano ancora oggi prive di diagnosi eziologica. Le tecniche tradizionali basate sull'isolamento virale e sulla ricerca di antigeni virali mostrano spesso i loro limiti nel rispondere alle crescenti esigenze diagnostiche, mentre l'impiego delle tecniche molecolari nella diagnosi delle infezioni respiratorie si presenta sempre più come una alternativa di grande sensibilità e di buona rapidità. Se ai fini diagnostici l'identificazione del genere di appartenenza del virus può essere sufficiente in certi casi, in altri casi può essere utile o addirittura necessaria una più fine tipizzazione, che è sempre fondamentale a scopo epidemiologico. Inizialmente sono state proposte e sviluppate varie applicazioni della polymerase chain reaction (PCR) e RT-PCR per i diversi virus, in versione singola o nested. Sono state anche sviluppate, sia pure in una percentuale di casi inferiore, altre tecniche di amplificazione del bersaglio o del segnale. Allo scopo di consentire un rapido screening almeno dei principali virus respiratori sono state introdotte reazioni "multiplex", volte a ricercare in una sola reazione, in presenza di coppie di primers diverse, i diversi potenziali agenti eziologici virali. Più recentemente sono state sviluppate, anche in questo settore diagnostico, tecniche di amplificazione *real time*, anche in versione multiplex. L'impiego di microarrays per la ricerca dei virus responsabili di infezioni respiratorie, per ora limitato dagli alti costi, è tuttavia molto promettente. Senza trascurare il significato e il ruolo dell'isolamento virale, lo sviluppo e l'applicazione di tecniche biomolecolari nell'identificazione e tipizzazione dei virus influenzali si propone come uno strumento adeguato anche nell'eventualità di una emergenza pandemia.

## EVOLUZIONE DELLA DIAGNOSI DA INFEZIONE DI VIRUS A TROPISMO EPATICO

Massimo Clementi

*Università Vita-Salute San Raffaele, Milano*

Le infezioni da virus a tropismo per l'epatocita rappresentano nel loro insieme un capitolo importante dell'attività di virologia diagnostica in tutto il mondo a causa della notevole diffusione di questi agenti. Negli ultimi anni, inoltre, le incrementate opzioni terapeutiche, l'importanza che il monitoraggio delle infezioni virali persistenti ha assunto nel soggetto trapiantato, l'influenza che infezioni diverse dello stesso ospite possono avere tra loro, hanno rappresentato elementi che hanno amplificato e reso più complesso il ruolo del laboratorio virologico in questo campo. In questa relazione si affrontano principalmente gli aspetti nuovi dell'attività diagnostica verso i due principali agenti di epatite virale acuta e cronica, il virus dell'epatite B (HBV) e il virus dell'epatite C (HCV). In particolare, nel primo caso sarà dato rilievo alla reale importanza diagnostico-clinica che può avere l'infezione occulta da HBV, soprattutto nell'ospite immunocompromesso. Nel secondo caso, si evidenzierà come si articolano i tentativi di distinguere infezioni a diversa prognosi e a diversa attività virale. Infine, si porrà attenzione alla valutazione delle nuove conoscenze di eziopatogenesi e dei rapporti virus-ospite ottenute proprio, in questo settore, da una applicazione illuminata di strategie diagnostiche.

## CHLAMYDIA TRACHOMATIS: PROSPETTIVE PER UN VACCINO

Roberto Cevenini

*Università degli Studi di Bologna*

*Dipartimento di Medicina Clinica Specialistica e Sperimentale*

*Sezione di Microbiologia*

*Chlamydia trachomatis* è un agente batterico, tra i più importanti, di infezioni oculari (tracoma) e di infezioni sessualmente trasmesse (uretriti non gonococciche, cerviciti, salpingiti) in grado di causare severe sequele come infertilità tubarica e gravidanza ectopica. Le infezioni da *C.trachomatis* hanno inoltre la caratteristica di poter essere paucisintomatiche o asintomatiche, quindi facilmente misconosciute e non trattate. Pur essendo chiaro che un vaccino sarebbe ampiamente giustificato per questo tipo di infezioni, al momento esso non è disponibile, nonostante i numerosi studi finora eseguiti sulla risposta immune nelle infezioni sostenute da *C.trachomatis*. Il primo tentativo di vaccinazione nei confronti di *C.trachomatis* fu eseguito a metà degli anni '60 del secolo scorso su bambini in un'area di endemia del tracoma con un vaccino allestito con corpi batterici purificati: si osservò protezione nei confronti dell'infezione tracomatosa, ma solo di breve durata. Ulteriori studi con questo tipo di vaccino, eseguiti in vari modelli animali negli anni '80 e '90 del secolo scorso, hanno però evidenziato la comparsa di reazioni di ipersensibilità cosicché, successivamente si optò per l'allestimento di vaccini costituiti da molecole batteriche in grado di indurre immunità. La prima molecola descritta con attività immunogenica è stata la MOMP (major outer membrane protein) collocata sulla superficie esterna del soma batterico. Tale molecola è stata studiata con molta attenzione come possibile candidato per un vaccino. Vaccini allestiti con MOMP ricombinante, MOMP nativa, MOMP DNA sono stati provati in modelli animali (topo e hamster). Anche se i vari preparati non hanno conferito protezione completa, tuttavia si è osservata, nell'animale da esperimento, una diminuzione dell'eliminazione dei batteri, associata alla stimolazione di una risposta immune, sia umorale che cellulo-mediata, in assenza di reazioni di ipersensibilità. E' possibile prevedere che l'aggiunta di altre sub-componenti vaccinarie, quali per esempio la proteina a codificazione plasmidica *pgp3* che si è dimostrata immunogena anche nell'uomo ed eventualmente altre, possano aumentare il livello di protezione.

## DECONTAMINAZIONE BIOLOGICA DI SUOLI CON POLICLOROBIFENILI (PCB): LIMITAZIONI E NUOVE STRATEGIE DI PROCESSO

Fabio Fava

DICASM, Facoltà di Ingegneria. Università di Bologna - Viale Risorgimento, 2. 40136 Bologna - fabio.fava@unibo.it

Le tecnologie di biorisanamento sono considerate di grande interesse nella bonifica di suoli e siti contaminati. Numerosi studi hanno dimostrato l'applicabilità delle stesse anche nella bonifica *ex-situ* di suoli con policlorobifenili (PCB)<sup>1</sup>. Il processo, mediato da *consortia* di batteri aerobi in grado di cometabilizzare PCB e di mineralizzare acidi clorobenzoici<sup>2</sup>, è di norma favorito dalla presenza di O<sub>2</sub>, bifenile e nutrienti inorganici, nonché da condizioni di trattamento in grado di fornire un alto grado di miscelazione e di omogeneità all'interno del suolo<sup>1</sup>. Il processo è tuttavia sovente limitato, specie nel caso di suoli ricchi di materiale organico e/o con una lunga storia di contaminazione, dalla scarsa biodisponibilità degli inquinanti, i quali, data la loro spiccata lipofilia, tendono ad adsorbirsi nella fase organica del suolo, diventando poco disponibili in quella acquosa dello stesso, dove sono di norma presenti i microrganismi in grado di degradarli<sup>1,3</sup>.

La "trattabilità biologica" di detti suoli potrebbe essere incrementata ammendandoli, prima del trattamento, con un opportuno agente in grado di favorire il desorbimento degli inquinanti<sup>3</sup>. Questa ipotesi è stata studiata poco ed in particolare impiegando tensioattivi non ionici di sintesi, i quali hanno mediamente mostrato un ottimo effetto "solubilizzante" verso i PCB ma anche persistenza e tossicità nella matrice ammendata, nonché attività inibitoria sui batteri specializzati e quindi sulla rimozione finale degli inquinanti<sup>4</sup>. Recentemente Fava *et al.*<sup>5-7</sup> hanno studiato la possibilità di impiegare allo stesso fine una miscela industriale di ciclodestrine metilate, *i.e.* RAMEB, saggiandola su 5 diversi suoli contaminati da PCB in reattori *batch* a fase *slurry* e fissa. RAMEB è risultato un ammendante molto promettente, non solo per il suo marcato effetto stimolante sulla *bioremediation* dei suoli, ma anche per la sua atossicità, biodegradabilità e basso costo. Il suo impiego è stato recentemente trasferito su scala pilota<sup>7</sup>. Nella relazione saranno presentati e discussi i risultati principali di questi studi e le possibili loro ricadute industriali.

Robinson (1998) *Biochem. Soc. Trans.* 26, 686 - Focht (1995) *Curr Opin Biotechnol* 6, 341 - Volkering *et al.* (1998) *Biodegradation* 8, 401 - Singer *et al.* (2000) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 838 - Fava and Ciccotosto (2002) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 393 - Fava *et al.* (2003) *Biotechnol. Bioeng.* 81, 381 - Molnár *et al.* (2005) *Biodegradation* 16, 159

## CLINICA DELLE INFEZIONI FUNGINE NEI PAZIENTI CRITICI NON NEUTROPENICI

R Tufano, E De Robertis, D Caliendo, CA Giuliano

Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Anestesiologiche, Rianimatorie e dell'Emergenza, Università degli Studi di Napoli "Federico II"

I cambiamenti demografici, la maggiore gravità delle patologie ed il miglioramento delle tecniche terapeutiche hanno comportato negli ultimi anni un incremento della durata del ricovero nelle terapie intensive (UTI) e della sopravvivenza dei pazienti, rendendoli più suscettibili alle infezioni.

Lo studio EPIC (European Prevalence of Infection in Intensive Care) mostrò che i funghi determinano il 17,1% di tutte le infezioni, rappresentando il quinto più comune patogeno [1], mentre più recentemente Marchetti [2] ha identificato *Candida species* come responsabile del 2-3% di tutte le sepsi. Dal '79 al '00 negli USA si è assistito ad un incremento dell'incidenza di sepsi in generale dell'8.7% con un aumento delle infezioni fungine del 207% (quarta causa di sepsi) [3].

Le più frequenti infezioni fungine sono le candidiasi (80%), associate ad un elevato tasso di mortalità (38%)[4].

La colonizzazione è un prerequisito indispensabile per l'infezione rappresentando uno dei principali fattori di rischio per la candidemia (OR 10.37) [4]. Inoltre lo sviluppo di Candidemia è correlato al numero di distretti corporei colonizzati. [5].

La diagnosi di infezioni fungine sistemiche, in assenza di dati clinici specifici e di una diagnosi istologica di certezza, è problematica. Attualmente si basa soprattutto sulla clinica, seguita dalla ricerca di *Candida* in campioni ematici ed in minima parte dal supporto laboratoristico. Per questo motivo è di fondamentale importanza identificare precocemente i pazienti ad alto rischio di colonizzazione e quindi di potenziale disseminazione.

I principali fattori di rischio per lo sviluppo di infezioni fungine sistemiche in UTI sono: l'immunosoppressione (neutropenia, AIDS, terapia corticosteroidica e trapianti), antibioticotierapia ad ampio spettro, accessi venosi centrali, nutrizione parenterale totale, ustioni e malnutrizione (solo quest'ultima è stata identificata anche come fattore predittivo di mortalità [6]) [4].

In conclusione, data la crescente diffusione delle infezioni fungine, i limiti diagnostici ed i benefici di una precoce terapia, è necessaria una continua sorveglianza dei pazienti, in particolar modo di quelli ad alto rischio.

### Referenze

Vincent JL *et al.* JAMA 1995; 274: 639-44. - Marchetti O *et al.* Clin Infect Dis 2004;28:311-20. - Martin GS *et al.* N Engl J Med 2003; 348:1546-54. - Wey SB *et al.* Arch Intern Med 1989; 149: 2349-53. - Martino P *et al.* Am J Med Sci 1993; 306: 225-32. Piazza O *et al.* Min Anest 2004; 70:63-9.

## LA VENTILAZIONE NON INVASIVA PREVIENE LA POLMONITE ASSOCIATA AL VENTILATORE?

E De Robertis, D Caliendo, CA Giuliano, A Varriale, R Tufano

*Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Anestesiologiche, Rianimatorie e dell'Emergenza, Università degli Studi di Napoli "Federico II"*

L'infezione nosocomiale è un evento molto frequente specialmente nelle unità di terapia intensiva (UTI), dove interessa in media il 45% dei pazienti ricoverati.

Le tipologie di infezioni più spesso riscontrate sono: polmoniti (53%), sepsi (23%) e infezioni delle vie urinarie (16%). [1,2,3,4] Le polmoniti nosocomiali (HAP) si manifestano quasi esclusivamente nei pazienti sottoposti ad intubazione (IOT) (fino al 90% dei casi). Infatti la ventilazione invasiva (VI) rappresenta uno dei più rilevanti fattori di rischio in quanto favorisce l'aspirazione delle secrezioni accumulate intorno alla cuffia del tubo endotracheale (TE). Per questo motivo, accanto alle misure generali di prevenzione definite da linee-guida, stanno assumendo un ruolo sempre crescente nuove strategie profilattiche quali: la decontaminazione selettiva subglottica, l'aspirazione continua di secrezioni subglottiche, la prevenzione della formazione del biofilm, la riduzione della durata dell'IOT.[5]

Poiché l'IOT e la VI incrementano il rischio di HAP da 6 a 21 volte, un'alternativa attraente è rappresentata dalla ventilazione non invasiva (NIV).

L'efficacia della NIV è ampiamente confermata in letteratura soprattutto nei pazienti con BPCO riacutizzata e con insufficienza respiratoria acuta ipossiemica.[6]

La recentissima meta-analisi di Hess [7] dimostra il ruolo svolto dalla NIV nella prevenzione della HAP. Hess ha estrapolato i dati da 12 studi epidemiologici, confrontando il tasso di polmoniti nei pazienti sottoposti a NIV rispetto ad un gruppo di controllo sottoposto a VI o ad altre terapie standard. Sebbene la NIV fallisca in circa il 40% dei casi, lo studio dimostra che essa è associata ad un più basso tasso di polmonite (RR 0.31, p=0.0002), intubazione e mortalità.

Questi risultati suggeriscono che le VAP non sono in realtà correlate all'uso del ventilatore bensì al TE; per tale motivo sembra necessario, ove possibile, evitare la IOT come prima linea di intervento e sviluppare le tecniche non invasive al fine di renderle più tollerate ed efficaci.

### Referenze

Malacarne P et al. *Min Anest* 2004;70:321-28. - Vincente JL et al. *JAMA* 1995; 274:639-44. - De Robertis E et al. *Min Anest* 2004; 70: 747-51. - De Robertis E et al. *Panminerva Med* 2005; 45: 65-66. - *ATS Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:388-16. Carlucci A et al. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:874-80. - Hess DR. *Respiratory Care*, 2005; 50:924-29.

## APOPTOSI E PATOGENICITÀ VIRALE

Sciortino M.T.<sup>1</sup>, Grelli S.<sup>2</sup>, Matteucci C.<sup>2</sup>, Macchi B.<sup>3</sup>, Mastino A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Scienze Microbiologiche, Genetiche e Molecolari, Università di Messina, Messina; <sup>2</sup>Dip. di Medicina Sperimentale e Sc.Biochimiche, e <sup>3</sup>Dip. Di Neuroscienze, Università di Roma "Tor Vergata", Roma.

Oltre a svolgere una funzione importante nei meccanismi di difesa rappresentati dalla risposta cellulare innata alle infezioni virali, l'apoptosi costituisce anche uno degli elementi coinvolti nell'azione patogena di diversi agenti infettivi virali. Infatti, se la replicazione e diffusione dei virus può essere limitata dalla risposta apoptotica cellulare dell'ospite, i virus hanno, tuttavia, evoluto molteplici strategie di sopravvivenza per sfuggire a questo meccanismo di eliminazione. L'interferenza con i segnali apoptotici e la loro disregolazione viene quindi utilizzata da una grande varietà di virus, ai fini di permettere il perdurare dell'infezione virale e/o di aumentare l'efficienza della replicazione virale. Ciò costituisce per diversi virus un importante elemento eziopatogenetico. L'uso dell'apoptosi a proprio vantaggio, sembra così essere una subdola strategia adottata da alcuni virus per trasformare un meccanismo di resistenza dell'ospite in un mezzo per contrastarne l'apparato difensivo ed, al tempo stesso, causargli talvolta gravi danni, compresa l'insorgenza di neoplasie di origine virale. Dopo aver fornito un'inquadratura generale dell'argomento, il relatore passerà in rassegna alcuni dei risultati ottenuti con i propri collaboratori nelle ricerche su apoptosi ed infezioni da retrovirus umani e da herpesvirus negli ultimi anni, soffermandosi in particolare su recenti indagini su apoptosi ed immortalizzazione/trasformazione nell'infezione da HTLV-1 e sul ruolo del proto-oncogene Bcl-2 e del fattore di trascrizione NF-kB nelle infezioni da virus herpes simplex.

## VACCINI MUCOSALI: APPLICAZIONI DELLE TOSSINE DEL *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

Ignazio Castagliuolo, Federica Ditadi, Michela Cecchetto, Elisa Beggiao, Paola Brun, Enzo DeFilippis, Giorgio Palù.

Dipartimento di Istologia, microbiologia e biotecnologie mediche e Scienze Farmaceutiche Università degli Studi di Padova.

Un aspetto che accomuna gli adiuvanti mucosali è la struttura lectino-simile, riscontrabile in tossina colerica, tossina labile al calore di *E. coli*, e lectine vegetali come la Mistletoe lectin: i più efficaci adiuvanti mucosali noti. Tuttavia, l'attività tossica di queste molecole ne limita l'utilizzo nell'uomo. Per identificare nuovi adiuvanti mucosali ci siamo concentrati sulla tossina A del *Clostridium difficile*, la cui estremità C-terminale, dominio coinvolto nel legame al recettore, presenta una sequenza amminoacidica caratterizzata da unità ripetitive che le conferisce una struttura lectino-simile. Ipotizzando che la struttura ripetitiva potesse garantire un'attività adiuvante, ne abbiamo clonato, espresso e caratterizzato un frammento che includeva 314 AA (TxAC314). Tale frammento presenta una struttura prevalente ad alfa elica, è privo di attività tossica ma conserva proprietà funzionali della olotossina quali la capacità di legame alla mucosa intestinale e di internalizzazione in cellule epiteliali. Tale peptide co-somministrato in vivo per via mucosale con vari antigeni ha potenziato la risposta immunitaria specifica, sia umorale [sistemica e mucosale] che cellulo-mediata, con prevalenza della componente Th1. La TxAC314 sembra favorire la presentazione dell'antigene alle cellule immuno competenti come evidenziato dalla up-regolazione del CD80 in cellule dendritiche e dal potenziamento della risposta antigenica specifica in linfociti immuni.

Sfruttando la capacità di internalizzazione in cellule epiteliali di TxAC314 abbiamo provato a utilizzarla, previa fusione genica con una sequenza di 35 lisine (TxAC314-PLL), anche come vettore non-virale per veicolare materiale genetico. Saggi di gel-retardation e trasferimento di geni reporter in cellule eucariotiche, hanno dimostrato che la TxAC314-PLL lega e veicola efficientemente pDNA. Infine la somministrazione del poliplesso TxAC314-PLL + pDNA codificante per ovalbumina a topi Balb/c provoca uno shift della risposta immunitaria indotta dalla sensibilizzazione con ovalbumina, favorendo la produzione di IgG e sopprimendo la produzione di IgE specifiche.

In conclusione, il frammento TxAC314 della tossina A del *C. difficile* presenta una significativa attività adiuvante mucosale che combinata alla stimolazione della risposta Th1 ne fanno un interessante candidato allo sviluppo di vaccini mucosali.

## ANALISI MOLECOLARE DEL PROCESSO DI PATOGENESI DI *SHIGELLA FLEXNERI*: STRUTTURE BATTERICHE E RISPOSTE DELL'OSPITE.

Maria L. Bernardini\*, Maria Celeste Martino\*, Giacomo Rossi\*\*.

\*Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università di Roma « La Sapienza »

\*\* Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Camerino.

I batteri appartenenti al genere *Shigella* sono patogeni umani, agenti eziologici della dissenteria bacillare o shigellosi. Una dose infettiva di 100-1000 batteri è sufficiente a sviluppare questa malattia che si basa sull'invasione, da parte dei batteri, della mucosa del colon e del retto dove si instaura una abnorme reazione infiammatoria. Contribuiscono allo sviluppo del processo infiammatorio sia fattori specifici delle shigellae, quali quelli espressi dai geni presenti sul plasmide di virulenza, sia alcune strutture batteriche, tra le quali il peptidoglicano, i lipolisaccaridi e le lipoproteine, oggi conosciute come Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs.

I PAMPs, comuni a tutti i microrganismi, vengono selettivamente riconosciuti da alcuni recettori, i Pattern Recognition Molecules, PRMs, presenti nella maggior parte dei vertebrati. In seguito a questo riconoscimento l'attivazione di una serie di fattori trascrizionali, fra cui NF- $\kappa$ B, porta all'innescamento della immunità innata e quindi dell'infiammazione.

Nel caso di *Shigella* è stato dimostrato che le shigelle intracellulari provocano l'attivazione di NF- $\kappa$ B nelle cellule epiteliali in seguito al riconoscimento del motivo iE-DAP contenuto nel peptidoglicano da parte del PRM Nod1. Questa interazione stimola la produzione di interleuchina 8, primo passaggio nell'attivazione della risposta infiammatoria.

Il nostro lavoro ha affrontato il quesito di come poter modulare il processo infiammatorio indotto dalle shigelle modificando l'interazione dei PAMPs, in particolare il peptidoglicano, con i PRMs.

A questo scopo abbiamo costruito una serie di ceppi di *Shigella flexneri* alterati nella struttura e nel processo di riciclo del peptidoglicano. Questi ceppi sono stati saggiati in vari modelli animali per analizzare i livelli di virulenza e caratterizzare la reazione infiammatoria e in saggi cellulari volti a valutare l'attivazione del fattore trascrizionale NF- $\kappa$ B. I nostri risultati mostrano che modificando qualitativamente e quantitativamente il riconoscimento del peptidoglicano di *Shigella* da parte di Nod1 si alterano non solo l'intensità ma anche le caratteristiche della risposta infiammatoria ed in definitiva i livelli di virulenza.

## USO DI SPORE BATTERICHE COME PROBIOTICI E VETTORI DI VACCINAZIONE MUCOSALE

Ezio Ricca

Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università Federico II, Napoli

I Bacilli sporigeni sono batteri gram-positivi che in condizioni di carenza nutrizionale formano una endospora (spora), una forma cellulare semi-quiescente capace di resistere a condizioni chimico-fisiche letali per altri tipi di cellule. Il processo di formazione della spora è un sistema semplificato di differenziamento cellulare in quanto due cellule figlie originate dalla stessa cellula madre, pur avendo un genoma identico, hanno programmi di espressione genica, morfologia e destini totalmente differenti. La possibilità di affrontare problemi legati al differenziamento cellulare in un sistema modello semplificato insieme alle peculiarità strutturali delle spore hanno attratto l'interesse di numerosi studiosi fin dagli anni '60 rendendo oggi *Bacillus subtilis*, la specie più studiata tra i batteri sporigeni, uno dei sistemi biologici meglio caratterizzati.

Più recentemente, all'interesse scientifico di base, si è rivolto verso i bacilli sporigeni anche un interesse applicativo con le spore utilizzate in numerosi preparati probiotici e come potenziali vettori di vaccinazione. Numerose specie appartenenti al gruppo dei Bacilli sporigeni aerobici, tra cui anche *B. subtilis*, non sono patogene per l'uomo e le spore di tali specie sono diffusamente utilizzate come prodotti probiotici e/o come farmaci per la cura di disturbi gastro-intestinali. Tale uso delle spore, sebbene consolidato, è tuttora empirico. Non è noto il meccanismo con il quale le spore esercitano un effetto benefico per la salute umana e solo recentemente cominciano ad accumularsi dati scientifici sul destino e l'effetto di spore ingerite oralmente (1, 2).

La non patogenicità è anche il punto di partenza per considerare le spore per la presentazione di antigeni ed esperimenti effettuati con antigeni eterologhi modello ne hanno confermato le potenzialità come efficaci veicoli di vaccinazione a livello delle mucose (3, 4, 5).

Dati recenti sul meccanismo di azione delle spore sia come probiotici sia come vettori di vaccinazione mucosale verranno presentati e discussi.

- 1) Duc, L.H., Hong, H.A., Cutting, S.M. (2003) *Vaccine* **21**:4215.
- 2) Duc, L.H., Hong, H.A., Barbosa, T.M., Henriques, A.O., Cutting, S.M. (2004) *Appl. Env. Microbiol.* **70**:2161.
- 3) Duc, L.H., Hong, H.A., Fairweather, N., Ricca, E., Cutting, S.M. (2003) *Infect&Immun.* **71**:2810.
- 4) Mauriello, E., Duc, L. H., Istatico, R., Cangiano, G., Hong, H. A., De Felice, M., Ricca E., Cutting, S. M. (2004) *Vaccine* **22**:1177.
- 5) Ciabattini, A., Parigi, R., Istatico, R., Oggioni, M.R., Pozzi, G. (2004) *Vaccine* **22**:4139.

## PROTEINE INFIAMMATORIE E CONTROLLO DELLA REPLICAZIONE VIRALE

M.Gabriella Santoro, Carla Amici, Giuseppe Belardo, Antonio Rossi.

Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tor Vergata e Istituto di Neurobiologia e Medicina Molecolare CNR, Roma.

L'avanzamento nelle conoscenze dei meccanismi molecolari alla base delle interazioni virus-cellula ospite ha recentemente portato alla comprensione di sofisticate strategie utilizzate dai virus per dirigere la sintesi proteica cellulare e/o virale attraverso il controllo di diversi pathway di trasduzione del segnale e di fattori di trascrizione cellulari. In particolare il sistema IKK/NF- $\kappa$ B si è rivelato un bersaglio preferenziale di diversi virus patogeni per l'uomo. Il fattore nucleare NF- $\kappa$ B controlla un'importante serie di eventi coinvolti nella regolazione della sopravvivenza cellulare e della risposta infiammatoria. L'attivazione di NF- $\kappa$ B è essenziale per la sintesi di un elevato numero di citochine infiammatorie, recettori di citochine, molecole di adesione cellulare ed enzimi coinvolti nella sintesi di molecole infiammatorie quali COX-2 e iNOS. Molti virus patogeni per l'uomo sono in grado di attivare NF- $\kappa$ B e, attraverso questo fattore, di controllare la risposta infiammatoria e la sopravvivenza della cellula ospite. Inoltre, alcuni virus che posseggono nel loro genoma sequenze di riconoscimento di NF- $\kappa$ B, possono utilizzare il fattore per aumentare l'espressione dei geni virali. I nostri studi recenti dimostrano che NF- $\kappa$ B è utilizzato in maniera differenziata da virus diversi e, mentre ha un ruolo centrale nell'attivazione di processi infiammatori durante l'infezione con virus influenzali, è preferenzialmente coinvolto nella regolazione di geni virali durante l'infezione erpetica. Queste osservazioni suggeriscono che l'attivazione di NF- $\kappa$ B, più che una risposta aspecifica della cellula ospite all'infezione virale, rappresenta un fattore chiave nella regolazione della replicazione virale e di patologie infiammatorie indotte da virus. La comprensione dei meccanismi molecolari alla base dell'attivazione e della funzione di NF- $\kappa$ B durante l'infezione virale può quindi indicare strategie innovative per il controllo delle malattie da virus.

## MECCANISMI DI RESISTENZA E TOLLERANZA AI FARMACI ANTIFUNGINI NEI LIEVITI PATOGENI

Maurizio Sanguinetti, Brunella Posteraro e Giovanni Fadda

Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Diversi patogeni fungini possono sviluppare meccanismi di resistenza sotto diverse condizioni quando esposti ai farmaci. Tale fenomeno è soprattutto evidente in *Candida albicans* e le specie di lievito patogene per l'uomo, e si esplica principalmente nei riguardi dei composti azolici, attraverso l'espressione di pompe di efflusso che riducono l'accumulo del farmaco, l'alterazione della struttura o della concentrazione delle proteine bersaglio dell'antifungino ed alterazione della composizione degli steroli di membrana. Le conseguenze cliniche della resistenza agli antifungini consistono in fallimenti terapeutici per i pazienti o in cambiamenti nella prevalenza della specie fungina che causa malattia. L'uso ripetuto di azoli (specialmente fluconazolo) per il trattamento dei pazienti HIV-positivi con infezioni fungine mucosali nel periodo precedente all'introduzione della terapia antiretrovirale ha favorito l'acquisizione di resistenza in diversi patogeni fungini. Maggiormente implicate sono le specie di *Candida*, tra cui (con importanza decrescente) *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*, e (meno frequentemente) le specie di *Cryptococcus*. La resistenza agli azoli nelle infezioni fungine sistemiche di pazienti con severa immunocompromissione è molto meno frequente e ed è stata descritta principalmente per *C. albicans*. Negli ultimi anni un'attiva ricerca è stata effettuata per delucidare le basi molecolari della resistenza agli azoli, potendo contare su un ampio numero di ceppi di lievito messi a disposizione dei laboratori di ricerca. Perciò, l'isolamento di vari alleli del gene che codifica per l'enzima bersaglio degli azoli ha permesso di correlare l'insorgenza di resistenza con distinte mutazioni. I meccanismi di resistenza agli azoli convergono anche nella sovra-regolazione di geni "multidrug transporter", i cui prodotti hanno la capacità di estrarre dalle cellule diversi agenti antifungini chimicamente non correlati e composti tossici. Attualmente, studi "genome wide" condotti su ceppi azolo-resistenti permettono di effettuare un'analisi più approfondita dell'impatto della resistenza sull'espressione genica e, di conseguenza, possono aprire nuovi orizzonti sui meccanismi genetico-molecolari.

## MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSPECIES PARATUBERCULOSIS E INTERAZIONI CON L'OSPITE

Leonardo A. Sechi

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari

*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* è parte del gruppo *Mycobacterium avium* insieme a *Mycobacterium avium* subspecies *avium*, *Mycobacterium avium* subspecies *silvaticum*, *Mycobacterium avium* subspecies *hominisuis*. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* è la causa della malattia di Johne, una infezione cronica del tratto intestinale di bovini e ruminanti in genere. È stato inoltre isolato da numerose altre specie animali monogastriche quali conigli, suini, canguri, uccelli e primati. *Mycobacterium paratuberculosis* ha un tempo di duplicazione estremamente lento, per osservare lo sviluppo di una colonia su terreno solido (come Herrold egg yolk o lowenstein Jensen) sono necessari oltre 3 mesi. Negli ultimi anni, *M. paratuberculosis* è stato associato sempre con più evidenza al morbo di Crohn (CD) nell'uomo sebbene non siano state adottate prove definitive. Questi micobatteri invadono i macrofagi presenti nei tessuti linfoidi ileali, all'interno dei quali inibiscono la maturazione dei fagosomi e inducono il reclutamento di cellule infiammatorie causando una enterite granulomatosa. Questi granulomi causano l'appiattimento e la distorsione dei villi diminuendo di conseguenza l'area di assorbimento. L'animale, quindi, ha una minore capacità di assorbire i nutrienti nell'intestino con conseguente perdita di peso e in casi estremi morte. Sebbene gli animali siano infettati prima dei 6 mesi di vita mediante l'ingestione di materiale contaminato (latte e feci), la diarrea profusa e la perdita di peso non sono osservati che molti anni più tardi complicando lo sforzo per il controllo della malattia. I vaccini in commercio non proteggono dall'infezione ma rallentano solo la disseminazione dei batteri nell'ambiente, verranno presentati dati sull'utilizzo di nuovi vaccini a DNA. Micobatteri mancanti della parete cellulare "cell wall deficient", possono assumere un ruolo importante nella patogenesi della malattia di Johne negli ovini e soprattutto nel morbo di Crohn nell'uomo. *M. paratuberculosis* cell wall deficient, o sferoplasti, sono stati isolati da tessuti di pazienti affetti dal morbo di Crohn in diversi laboratori, aggiungendo al liquido di coltura mycobactina J. Studi recenti hanno dimostrato come il polimorfismo presente nel gene NOD2/CARD15 sia associato con circa il 15% dei pazienti con il morbo di Crohn. Il recente sequenziamento del genoma di *M. paratuberculosis* ha permesso di fatto l'identificazione di geni e antigeni coinvolti nella virulenza di questo patogeno.

## GLICOPROTEINA H DELL'HSV-1: RELAZIONI STRUTTURA/FUNZIONE

Massimiliano Galdiero

Dipartimento di Medicina Sperimentale - Facoltà di Medicina e Chirurgia - Seconda Università di Napoli

L'*envelope* dell'Herpes simplex virus 1 (HSV-1) contiene numerose proteine, molte delle quali glicosilate, coinvolte nelle prime fasi dell'infezione virale, quali l'adesione e la penetrazione delle particelle virali nella cellula ospite. In particolare, l'entrata dell'Herpes simplex virus 1 (HSV-1) nella cellula ospite e la fusione delle due membrane richiede l'azione di quattro glicoproteine virali (gB, gD, gH e gL). La glicoproteina gH, conservata in tutti i membri della famiglia degli herpes virus, presenta caratteristiche tipiche delle proteine di fusione; il suo ectodominio è stato analizzato in dettaglio con tecniche di mutagenesi *in vitro* e di bioinformatica al fine di identificare domini della proteina capaci di interagire fortemente con le membrane inducendone la fusione e per individuare potenziali domini ad *heptad repeat*.

L'analisi dell'idrofobicità all'interfaccia calcolata con la scala di Wimley & White ha evidenziato sei picchi; peptidi sintetici corrispondenti a quattro di questi picchi sono in grado di indurre la fusione di liposomi. Esperimenti con miscele equimolari di peptidi dell'HSV hanno indicato che differenti regioni fusogeniche hanno un'azione sinergica, infatti, la percentuale di fusione ottenuta con la combinazione di quattro peptidi è più alta della somma delle percentuali di fusione dei singoli peptidi. La caratterizzazione funzionale e strutturale di questi peptidi suggerisce che la glicoproteina gH presenta diversi domini interni che partecipano alla fusione. Questi dati sono stati ulteriormente supportati da studi di dicroismo circolare e da misure di fluorescenza. Inoltre, sono state identificate due regioni HR nella glicoproteina gH e due regioni HR in gB. Sono stati sintetizzati una serie di peptidi corrispondenti ai possibili *heptad repeats* e gli esperimenti effettuati dimostrano che i peptidi sintetizzati inibiscono, in maniera dose-dipendente, la penetrazione virale. In particolare, delle due regioni analizzate per la glicoproteina gH, solo quella con maggiore propensione a formare *heptad repeats* riduce significativamente l'infettività virale. Mediante tecniche biofisiche sono state valutate le possibili interazioni tra i peptidi sintetici corrispondenti agli HR della stessa glicoproteina oppure delle due diverse glicoproteine. I risultati ottenuti suggeriscono un'interazione tra l'HR N-terminale e l'HR C-terminale di gH, che dai dati della mutagenesi risulta ricoprire un ruolo essenziale per la penetrazione del virus nelle cellule.

I dati ottenuti suggeriscono che la glicoproteina gH sia realmente quella maggiormente coinvolta nel processo di fusione e presenta alcune caratteristiche simili a quelle delle proteine di fusione di Classe I.

### Ringraziamenti

Questo lavoro è stato finanziato dalla EU con il contratto no.QLK2-CT-2002-00810

## DINAMICA E RIPARTIZIONE DELLE COMUNITÀ MICROBICHE DURANTE I TRATTAMENTI DI BIORISANAMENTO DI MATRICI AMBIENTALI CONTAMINATE

Daniele Daffonchio

DISTAM, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Milano

Via Celoria, 2. 20133 Milano

daniele.daffonchio@unimi.it

L'ampia diversità tassonomica e funzionale dei microrganismi rappresenta un importante strumento per il risanamento di siti e matrici ambientali contaminati da xenobiotici. Nei processi di risanamento è quindi essenziale un corretto monitoraggio delle specie microbiche che giocano un ruolo chiave nell'eliminazione degli inquinanti. Tuttavia nelle matrici ambientali complesse quali ad esempio suolo e acque di falda la maggior parte delle specie microbiche che giocano un ruolo essenziale nel mantenimento dell'ecosistema non possono essere facilmente isolate e coltivate. Gli approcci di studio basati sull'ecologia molecolare permettono superare il "paradosso della coltivazione" e seguire la dinamica e la ripartizione delle comunità microbiche, incluse le specie microbiche non coltivabili o difficilmente coltivabili, e dei loro geni catabolici durante i trattamenti di biorisanamento.

Nella presente relazione verranno illustrati una serie di approcci per studiare la dinamica e la ripartizione delle popolazioni microbiche durante trattamenti di biorisanamento di matrici ambientali contaminate. Verranno illustrati i risultati di tre "case studies" di monitoraggio delle dinamiche di popolazione microbica in tre matrici ambientali, suolo, acqua di falda ed aria rispettivamente contaminate da petrolio, 1,2-dicloroetano e benzene, durante tre diversi processi di biostimolazione.

Verranno infine presentate le recenti strategie per correlare la diversità microbica osservata nel sito contaminato e la funzione dei microrganismi implicati nella decontaminazione degli inquinanti.

## REAZIONI AVVERSE DA ANTIBIOTICI E APPROPRIATEZZA D'USO

Prof. Achille Patrizio Caputi

Dipartimento Clinico Sperimentale di Medicina e Farmacologia

Università degli Studi di Messina

Gli antibiotici, come tutti i farmaci, possono scatenare delle reazioni avverse e possono interagire con altre molecole farmacologiche contemporaneamente assunte dal paziente. Gli studi clinici effettuati in fase antecedente alla commercializzazione cercano di valutare non solo il loro profilo di indicazioni, ma anche il loro potenziale rischio. Tuttavia, la valutazione di quest'ultimo è molto limitata dalle caratteristiche peculiari dei trial clinici. Lo dimostra ad esempio il ritiro di alcuni antibiotici (es. temofloxacina) dopo solo alcuni mesi di commercializzazione. E' storicamente dimostrato che il profilo di rischio di un antibiotico, come di qualsiasi altro farmaco, evolve nel tempo, sia con l'aumento della esposizione, sia con il coinvolgimento di fasce di popolazione non incluse nella sperimentazione clinica pre-marketing, sia dalla introduzione di nuovi farmaci con i quali l'antibiotico non era mai giunto ad interagire.

Queste considerazioni devono essere tenute in debito conto ogni qual volta l'antibiotico viene appropriatamente usato. Ma ad una appropriatezza di indicazione non conseguentemente corrisponde una appropriatezza per popolazione (anziani, bambini, gravide, ecc), per patologie (quali antibiotici usare in pazienti con aritmie cardiache?, quali antibiotici allungano il QTc?), per farmaci concomitanti (quali antibiotici utilizzare contemporaneamente a farmaci substrato dell'isoenzima 3A4 del citocromo P450 o della G-glicoproteina?), per dose (in presenza di insufficienza renale?), per durata di terapia.

Una rilettura periodica della scheda tecnica dell'antibiotico e delle dear doctor letters, unitamente all'uso routinario di banche dati sulle interazioni sembra oggi necessario per ridurre la possibilità che l'uso di un antibiotico non determini una patologia:

## I NUOVI RISCHI DELLA TOXOPLASMOSI

Fabrizio Bruschi, Barbara Castagna, Mario Campa

Dipartimento di Patologia Sperimentale, B.M.I.E., Università di Pisa

La toxoplasmosi è un'infezione protozoaria distribuita ubiquitariamente, ma che ha sempre rappresentato un problema di sanità pubblica anche nei paesi industrializzati per il rischio di trasmissione verticale materno-fetale.

Accanto ai ben noti fattori di rischio di trasmissione, se ne sono aggiunti di nuovi negli ultimi anni.

Il consumo di acqua non filtrata aumenta il rischio di sieropositività per *Toxoplasma gondii* in un'area endemica del Brasile (sieroprevalenza fino all'80%), ad indicare la possibilità di trasmissione di oocisti con l'acqua (Bahia-Oliveira et al. 2003, Emerg Infect Dis 9: 55).

I mitili possono rimuovere e concentrare *T. gondii* da acqua contaminata con oocisti, ed il parassita, una volta presente nei tessuti e nell'emolinfa dei molluschi, rimane infettante per il topo. Essendo la specie *Mytilus* ed altri molluschi consumati dall'uomo, si ipotizza un rischio potenziale di toxoplasmosi derivante dal consumo di molluschi (Arkush et al. 2003, Int J Parasitol 33: 1087).

Oltre a nuovi rischi di contrarre l'infezione aumentano le conoscenze sulle possibili conseguenze di un'infezione da *Toxoplasma*. L'esposizione ad un ambiente rurale nell'infanzia potrebbe essere predittiva di sieropositività per *T. gondii*. Tuttavia, il più alto fattore predittivo per lo sviluppo di atopia in questi soggetti è il contatto regolare con gli animali da allevamento, anziché la sieropositività per *Toxoplasma* (Radon et al. 2004, Clin Exp Allergy 34: 1178).

Elevati livelli di IgG materne anti-*Toxoplasma* si associano con un aumentato rischio di schizofrenia in età adulta del nascituro (Brown et al., 2005, Am J Psychiatry 162: 767).

I soggetti con toxoplasmosi latente hanno un rischio significativamente maggiore di incidenti stradali in confronto agli individui normali. Il rischio relativo di incidenti del traffico diminuisce con la durata dell'infezione (Flegr et al. 2002, BMC Infect Dis 2 : 11).

La toxoplasmosi può essere responsabile di quadri particolarmente gravi, in situazioni di immunodeficienza acquisita come quella dovuta alla terapia anti-rigetto, ora che l'infezione da HIV non si accompagna più a fenomeni frequenti di riattivazione, grazie alla terapia HAART.

I trapianti in cui il rischio è particolarmente elevato sono quelli di midollo osseo allogenico, di cellule staminali, di cuore, di fegato, sia che il ricevente sia *Toxoplasma* negativo che positivo.

Per quanto riguarda il trapianto di fegato, sono stati segnalati casi fatali di riceventi *Toxoplasma*-negativi, al momento del trapianto, da donatori *Toxoplasma*-positivi (Botterel et al., 2002, J Clin Microbiol 40: 1648).

Per tutti questi motivi lo studio della toxoplasmosi riveste una notevole importanza.



## INDICE DEGLI AUTORI



**A**

Abelli L.A.	94			
Adlerstein D.	40			
Affronti M.	83			
Alessandrini F.	105			
Alexeeva I.V.	59			
Alfani A.	10			
Algarotti A.	87			
Alitano P.	8			
Allizond V.	40			
Allocati N.	34			
Aloisi A.	94			
Amato T.	44			
Ambretti S	78	86		
Ambu E.	21			
Amici C.	29	118		
Amicosante G.	58	61		
Ammatuna P.	82	83	90	
Ammendolia M.G.	13			
Amoresano A.	99			
Andreoli E.	92			
Angeretti A.	40			
Angiolella L.	79			
Anniballi F.	67			
Antinori A.	59	84		
Antonelli G.	48	104		
Antonucci R.	95			
Anzivino E.	24			
Aquaro S.	25	79		
Aquilanti L.	71			
Arancia S.	73			
Arcangeletti M.C.	94			
Ardito F.	37			
Argentini C	88			
Arista S.	41			
Arru G.	88			
Artini M.	99			
Astolfi A	40			
Astone V.	88			
Auffray Y.	101			
Aureli P.	35	36	67	68
	69			
Auricchio L.	15			
Ausiello C. M.	36			
Avagliano G.	64			
Avolio M.	89			
Azzi A.	113			

**B**

Babini G.	58			
Baccagli A.	26			
Bacciu D.	30	89		
Badolato R.	96			
Baffone W.	37			
Baj A.	108	109	110	
Balduino G.	39	46	60	
Balestrieri E.	20	91		
Banche G.	40			
Bandettini R.	8			
Barbagallo L.	20			
Barbaro R.	44	47		
Baro S.	45	54	80	
Barreca G.S.	49			
Baschieri S.	93			
Bassi M. R.	66			
Bassotti E.	37			
Batoni G.	93	105		
Battaglia F.	33			
Battista B.	108			
Beerenwinkel N.	84			
Beggiao E.	117			
Belardo G.	29	118		
Bellincampi L.	80			
Bellocchi M.C.	79	84		
Bellomi F.	104			
Bendinelli M.	92	98		
Benedetti D.	2			
Benedetto A.	5	70		
Beneduce G.	65			
Benvenuto E.	93			
Bergallo M.	45	51	54	63
	80			
Bergamini A.	97			
Berlutti F.	23	31	46	
Bernasconi C.	108	109		
Bernardini M.L.	117			
Bernardini S.	80			
Bernengo M.G.	51			
Berrilli F.	80			
Bertoli A.	84			
Bertozzi A.	66			
Berutti E.	40			
Betta P.	62			
Bettaccini A.	109			
Bianchi F.	4	111		





Costa S.	86			
Costanzo A.	29			
Costanzo R.	2			
Cottarelli A.	28			
Cozza V.	22			
Craxì A.	38	88		
Cricca M.	78	86		
Cringoli G.	72			
Crisafi G.	19	29		
Crivello A.	5			
Croera C.	24			
Cucchiara S.	64			
Cuffini A. M.	29	40		
<b>D</b>				
D.Pesce C.	97			
D'Agostini C.	5	21		
D'Ambrosio F.	70			
D'Andrea A.	62			
d'Arminio				
Monforte A.	84			
D'Arrigo R.	59			
D'Ercole S.	56	104		
d'Ettore G.	91			
D'Inzeo T.	32			
D'Isanto M.	11	13		
D'Orazi C.	80			
D'Ottavio M.C.	36	68		
Dacarro C.	26			
Daffonchio D.	120			
Daglia M.	26			
Daniele R.	96			
Daperno M.	45			
Daprai L.	24			
Dato S.	5			
Dazzi A.	91			
De Bernardis F.	73	95		
De Cal M.	39			
De Cesare A.	37			
De Chiara G.	85			
De Conto F.	94			
De Fanti A.	94			
De Filippis A.	22			
De Filippis E.	117			
De Francesco M.A.	87			
De Grazia S.	41			
de Heer E.	16			
De Logu A.	59	69		
De Lorenzo A.	56			
De Martino L.	52			
De Medici D.	67			
De Robertis E.	115	116		
De Ruvo N.	91			
Debbia E.A.	8	9	16	39
	100			
Debiaggi M.	87			
Degener A.M.	24			
Deiana P.	19	20		
Del Chierico F.	31	74		
Del Grosso M.	70			
del Mar Lleo M.	2			
Del Pezzo M.	58	64		
del Piano M.	14	39	46	60
	111	113		
Del Prete A.	65			
Del Sante M.	94			
Delibato E.	67			
Della Cioppa N.	108			
Dellaglio F.	89			
Delogu G.	44			
Deriu A.	28	89		
Desogus A.	50			
Dessi D.	41	86		
Dettori G.	81	90	94	97
	98			
Di Bartolomeo S.	11			
Di Campli E.	6	11		
Di Cave D.	80			
Di Francesco P.	56			
Di Garbo A.	42			
Di Ilio C.	34			
Di Luca D.	83	102		
Di Luca M.	93			
Di Marco P.	48			
Di Marco V.	38			
Di Monaco F.	24			
Di Palma A.	12			
Di Pierro D.	56			
Di Pietro M.	14	39	46	60
Di Renzo L.	94			
Di Silverio F.	24			
Di Sora F.	91			
Di Stefano R.	38	88		
Dianzani F.	104			
Diaz N.	41	86		





**L**

La Sorda M.	100	
Lai C.	50	
Lamberti A.G.	49	
Lamberti F.	8	
Lambiase A.	58	
Landini M.P.	91	
Landolfo S.	92	
Lanini L.	92	
Lanzieri N.	12	
Lanzilli G.	28	
Latronico M.	39	
Lauro A.	91	
Laus M.	107	
Lavagna A.	45	
Lazzarotto T.	91	
Le Breton Y.	101	
Lembo D.	92	
Leonardi V.	6	
Leone A.	10	
Leone F.	32	
Leori G.	89	
Lepore S. M.	15	
Letizia V.	63	
Levriero M.	29	
Liberto M.C.	49	
Libertucci D.	63	
Lico C.	93	
Lo Biundo C.	41	
Lo Pizzo T.	33	
Lo Russo L.	48	
Longhia C.	13	
Losso M.A.	15	
Lovato L.	88	
Lucciarini R.	73	
Lucido M.	65	66
Lucivero G.	60	
Luongo C.	66	
Luongo M.	66	
Lupetti A.	16	
Lustrato G.	31	
Luzzani A.	38	
Luzzaro F.	58	77

**M**

Macchi B.	20	91	116
Maccioni D.	69		
Maccioni E.	69		
Macone A.	14		
Madeddu G.	44		
Madeddu M.A.	50		
Maggi F.	92		
Magi G.	43	54	
Magliani W.	76	93	99
Magnapane S.	69		
Mai A.	103		
Maida C.M.	17	51	
Maida I.	44		
Malsano C.	108		
Maisetta G.	93		
Mameli G.	88		
Mammìna C.	47		
Manca N.	81	87	98
Mancinelli L.	37		
Mancuso R.	3		
Mandatari G.	9		
Mandatari G.	17		
Mandras N.	29	40	
Manfreda G.	37		
Manganelli R.	73		
Mangia N. P.	20		
Mangioni C.	106		
Manzara S.	43	49	
Manzin A.	32		
Maras B.	14	22	79
Marchese A.	16		
Marchetti S.	33	43	49
Marcocci M.E.	85		
Marconi S.	88		
Maressi I.	65		
Margio S.	63		
Marini E.	89		
Marino A.	19	25	68
Marino Merlo F.	102		
Mariottini G.L.	100		
Marmocchi F.	104		
Marongiu R.	19		
Marra R.	11		
Martinelli M.	94		
Martino M.C.	117		



**O**

Oggioni M.R.	34	75		
Oliosio D.	48			
Oliva B.	46			
Oliveri S.	4	51	62	111
Onodera T.	109	110		
Orienti C.	34			
Orlando M.	22			
Orsi C.F.	3			
Orsini M.	31			
Ortega De Luna L.	65	66		
Ortu S.	52	89		
Ottaviani D.	45	61		

**P**

Pagani L.	55	58		
Pagliarulo C.	8			
Paglietti B.	55			
Pagnini U.	52			
Pagnotti P.	48			
Palamara A. T.	21	79	85	99
	103			
Palange P.	95			
Palazzo R.	36			
Palchykovska L.I.	59			
Palù G.	117			
Paludetti G.	37			
Pane L.	100			
Pantosti A.	70	95	110	
Panzanella F.	23			
Paoletti C.	43	54		
Paoletti I.	12	15		
Paolillo R.	26	27		
Papetti A.	26			
Parea M.	87			
Pasolini M.P.	52			
Pasqualini D.	40			
Passariello C.	23	103		
Passaro P.	60			
Patrone V.	37			
Peakman M.	85			
Pecorini G.	32			
Pedone C.	11	30		
Peppoloni S.	6	75		

Pera A.	45			
Perandin F.	81	87	98	
Perego P.	106			
Perfetto B.	18			
Pericolini E.	96			
Perilli M.	58	61		
Perino A.	90			
Perno C.F.	25	59	79	84
Pert C.B.	25			
Peruzzi S.	97			
Pessina A.	24			
Petagna C.	58			
Petrazzuolo M.	22			
Petrelli D.	56	104		
Petrucca A.	31	60		
Pezzone L.	60			
Pezzini F.	6			
Piacentini M.	24			
Piana F.	54	63		
Piccoli S.	64			
Piccolo G.	81	90	97	98
Pierangeli A.	48			
Pietropaolo V.	24			
Pilloni P.A.	42			
Pinardi F.	94			
Pinna AD.	91			
Pinti M.	3			
Pirina P.	44			
Pisciotta M. G.	47			
Pistello M.	92	98		
Pizzillo P.	38			
Pizzimenti A.	25			
Pizzimenti F.	19	25	68	
Platia M.A.	47			
Poggiali F.	99			
Polianova M.	25			
Pollicita M.	25	79		
Polonelli L.	76	93	99	
Pompei R.	50			
Ponti R.	51			
Pop S.	91			
Porta R.	100			
Posteraro B.	32	33	100	101 119
Potena A.	52			
Pozzi G.	10	34	75	
Prenna M.	104			

Prenna M.	56			
Prete S.P.	28			
Prisco F.	60			
Procopio F.	29	68		
Pruzzo C.	26	43	54	100
Pucci P.	99			
Puccio R.	49			
Puglisi S.	18	57		

## Q

Quadrifoglio F.	97			
Quagliuolo L.	22			
Quarta A.	100			
Quirino A.	49			

## R

Raieta Katia	11			
Raimondi A.	24			
Ramirez S.	41			
Ranalli G.	31			
Ranazzi A.	25	79		
Rao M.	13			
Rapicetta M.	88			
Rappelli P.	41	86		
Rassu M.	39			
Ravagnan G.	28			
Ravani A.	98			
Ravarino D.	96			
Re M.C.	105	112		
Reale S.	23			
Reina A.	50			
Renda V.	104			
Riboldi E.	96			
Ricca E.	118			
Ricci L.	81	98		
Ricci R.	94			
Ricci S.	10	75		
Rinaldi M.	81			
Ripa S.	56	104		
Riva E.	104			
Rizzo A.	26	27		
Roana J.	29			
Roberta D.	54			
Robuffo I.	11			
Rocchi G.	97			
Rocchi J.	92			

Romano C.	60			
Romano Caratelli C.	26	27		
Romano L.	33			
Romeo M.G.	62			
Romero E.	87			
Roschetto E.	64			
Roselli M.	65			
Rossano F.	58	64	65	
Rossi A.	29	118		
Rossi G.	117			
Rossi L.	9			
Rossolini G. M.	55	58		
Rotola A.	83			
Roveta S.	8			
Rubino S.	30	55	89	
Ruff M.	25			
Russo G.	4	24		

## S

Saba F.	44			
Saddi B.	59	69		
Saddi M.	59	69		
Saggio G.	57			
Sali M.	33			
Salvatore G.	95			
Salvatore P.	8			
Salvetti S.	84	101		
Sanciu G.	41			
Sanges M.R.	60			
Sanguinetti M.	32	33	100	101
	103	119		
Sanna M.G.	19			
Santagati M.	34	35		
Santangelo R.	32	33	43	49
Santini D.	78			
Santino I.	46	111		
Santoni F.	102			
Santoni G.	73			
Santoro M.	59			
Santoro M.G.	29	118		
Santoro M.M.	59	84		
Sarli S.	23	31		
Sasso S.	60			
Scagnolari C.	104			
Scalfaro C.	69			
Scaltrito M.M.	40	53	57	

Scazzocchio F.	46	111			Spensieri F.	36			
Schiavone P.	105				Stano A.	104			
Schiavoni G.	14	39	46	60	Stano P.	57			
Schininà E. M.	22				Stefanelli P.	22	50	103	
Schippa S.	13	23	64		Stefani S.	34	35	77	
Schito G.C.	100				Stepan E.	38			
Sciortino M.T.	20	102	116		Stiuso P.	18			
Scoarughi G.	99				Stivala A.	9			
Scroccarello F.	6				Stornello S.	96			
Scutera S.	96				Stringaro A.	79			
Sdrafkakis V.	25				Stroffolini T.	88			
Sechi L. A.	28	52	89		Sudano Roccaro A.	68			
Sechi L.A.	44	119			Sundsford A.	43			
Seganti L.	13	64			Superti F.	13			
Segantini A.	39				Svicher V.	59	84		
Selan L.	99								
Senesi S.	66	84	101		<b>T</b>				
Serra C.	27	88			Tafi M. C.	2			
Servillo G.	108				Tamburro F.	64			
Sessa R.	14	39	46	60	Taormina S.	5			
Sgarbanti R.	21	85	99		Tarallo S.	54			
Shestakova T.S.	59				Tarsi R.	26	100		
Shved A.D.	59				Tavanti A.	66			
Siddu A.	33	43	49		Tega L.	45	61		
Sidoti F.	45				Telecco S.	55			
Signori E.	81				Tempera G.	61			
Signoretto C.	4	111			Terulla C.	87			
Simonetti G.	103				Ticozzi R.	24			
Sinesi F.	63				Tili E.	32			
Sing T.	84				Timpanaro R.	9			
Sisto F.	40	53	57		Tondelli L.	107			
Smeraglia R.	76				Toniolo A.	58	77	108	109
Sofia T.	50					110			
Solbiati M.	38				Torelli R.	33			
Solidoro M.	63				Tornesello M.L.	82			
Solla D.	15				Tosti G.	89			
Sommese L.	60				Traini T.	6			
Sorrentino M.	66				Trappetti C.	75			
Sorrentino V.	108				Travagliane S.	7			
Sotgiu S.	88				Tricarico M.	28			
Sozzani S.	96				Triulzi C.	107			
Spalla M.	55	58			Tromba V.	48			
Spanu T.	32				Trovato L.	62	111		
Sparnacci K.	107				Tuchiya K.	110			
Speciale A.	18	57			Tufano M.A.	10	12	15	18
Speciale L.	3					22	42		

Tufano R.	108	115	116
Tullio V.	29	40	
Tuohy K.	17		
Turriziani O.	104		

## U

Usai D.	52		
Uzzau S. 30	55		

## V

Vaccari C.	91		
Valentini A.	80		
van Dissel J. T.	16		
Vannucci L.	98		
Varaldo P.E.	14	32	
Varriale A.	116		
Vassallo R.	83		
Vatteroni M.L.	92		
Vecchi M.	14	32	
Vecchiarelli A.	96		
Vella S.	91		
Venditti M.	95		
Venturoli S.	78	86	
Venuti A.	102		
Vermi W.	96		
Verneuil N.	101		
Vertuccio C.	44		
Villanacci V.	97		
Visone C.	65		
Vitale A.	14	39	46
Vitale F.	23	62	
Vitale M.a	62		
Vitali A.	79		
Vitali L. A.	56	104	
Vitello M.	11	13	30
Vitone F.	105		
Vittoria E.	37		
Voltan R.	107		
Vullo V.	91	104	
Vuono R.	15		

## W

Waldron K.	17		
Welling Mick M.	16		

## Z

Zaccarelli M	59			
Zaccaria D.	102			
Zagaglia C.	14	46	60	
Zamboni I.	64			
Zamora Martinez Y.	62			
Zanetti S.	28	33	44	52
	89			
Zannoni D.	78			
Zanone M.	85			
Zanusso G.	109			
Zenone B.L.	87			
Zerbini L.	94			
Zerbini M.	78	86		
Zorzi A.	38			
Zucca M.	96			
Zuelli C.	98			