

P021

DIAGNOSI DI LABORATORIO PER INFEZIONE DA TREPONEMA PALLIDUM, VALUTAZIONE DELLE RESISTENZE AI MACROLIDI TRAMITE SEQUENZIAMENTO DEL GENE 23S rRNA

G. Orrù, A. Scano, G. Serafi, M. Pautasso, P. Melis, F. Puggioni, S. Fais, A. Gigante, G. Serreli, P. Ferraguti, F. Coghe

Laboratorio analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia e Laboratorio Spoke di Biologia Molecolare, Dipartimento dei Servizi di Diagnosi e Cura, Azienda Ospedaliera Universitaria (AOU) Cagliari

Obiettivi: L'infezione sostenuta da *Treponema pallidum* (Tp) presenta, secondo i dati riportati dall'European Centre for Disease Control, ECDC e dell'OMS risultano allarmanti, sia per l'aumento di incidenza dei casi di sifilide, sia per la comparsa di ceppi resistenti o multiresistenti agli antibiotici. Lo scopo del lavoro è quello di utilizzare metodiche diagnostiche molecolari altamente specifiche che in tempi rapidi permettano di rilevare (anche a basse concentrazioni) *T. pallidum* e contemporaneamente rilevare le mutazioni genomiche a carico del gene 23S rRNA responsabili della resistenza ai macrolidi.

Materiali e Metodi: Da campioni provenienti da lesioni cutanee è stato estratto e poi amplificato il DNA tramite nested real time PCR, utilizzando primer specifici disegnati su una porzione del gene 23s rRNA. Il controllo positivo era rappresentato da un frammento di DNA a titolo noto contenente l'amplicone di PCR (606 bp). I campioni risultati positivi sono stati sequenziati con metodo capillare e comparati con la sequenza di riferimento GenBank NR_076531.

Risultati: La sensibilità del metodo è risultata pari a 100 genomi Tp/PCR, sono state rilevate 2 mutazioni principali nel target genico: (i) A2059G responsabile per resistenza alla Eritromicina e Azitromicina e (ii) A2058G per la Spiramicina.

Conclusioni: La sperimentazione eseguita dimostra l'affidabilità del metodo molecolare di cui il clinico può trarre vantaggio per un approccio terapeutico personalizzato e qualora il farmaco di elezione, la penicillina, non possa essere somministrato.

1. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2016. Syphilis. Stockholm: ECDC; 2016.

2. Baseline report on global sexually transmitted infection surveillance 2012. WHO Publication date: 2013 - ISBN: 978 92 4 150589 5

3. Stamm LV, Bergen HL. A point mutation associated with bacterial macrolide resistance is present in both 23S rRNA genes of an erythromycin-resistant *Treponema pallidum* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:806-7.

4. Centers for Disease Control and Prevention. Primary and secondary syphilis—United States, 2003–2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006;55:269-73.

P022

DIAGNOSI DI LABORATORIO PER INFEZIONE DA NOCARDIA SPP. TRAMITE PCR REAL TIME

F. Coghe, P. Melis, A. Scano, F. Puggioni, S. Fais, G. Serafi, P. Ferraguti, M. Pautasso, G. Serreli, A. Gigante, G. Orrù

Laboratorio analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia e Laboratorio Spoke di Biologia Molecolare, Dipartimento dei Servizi di Diagnosi e Cura, Azienda Ospedaliera Universitaria (AOU) Cagliari

Obiettivi: Diversi microrganismi appartenenti al genere *Nocardia* spp. possono causare infezioni eterogenee nell'uomo quali: malattie respiratorie, ascessi cerebrali, lesioni meningee, infezioni cutanee, articolari e oculari e le specie più frequentemente isolate sono *N. asteroides* e *N. brasiliensis*. La prognosi è favorevole, tranne nei casi di nocardiosi disseminata nei pazienti immunocompromessi. La diagnosi di laboratorio tradizionale a volte non è semplice e in genere si basa sull'osservazione microscopica del campione e sull'esame colturale. Lo scopo del lavoro è stato quello di utilizzare metodiche molecolari, quale la PCR real time, per arrivare a una diagnosi di laboratorio più veloce e specifica.

Materiali e metodi: Il DNA proveniente da diversi campioni, biopsie o tamponi cutanei prelevati da pazienti con sospetta Nocardiosi, è stato sottoposto ad amplificazione tramite PCR real time (light-Cycler Roche). La PCR amplificava un segmento di 228 bp lungo il gene *rrs* specifico per *Nocardia* spp; nei casi dubbi o dove è richiesta l'identificazione di specie, è stato possibile sequenziare l'amplicone con metodo capillare. La positività è stata valutata tramite l'analisi della curva di melting ($T_m=91$ °C) o tramite gel di agarosio. I risultati sono stati confrontati con il metodo colturale. Come controllo positivo è stato utilizzato un ceppo di collezione di *N. seriolae* (ATCC 43993).

Risultati: La procedura utilizzata è risultata più veloce (4 ore) e sensibile rispetto al metodo colturale tradizionale, il limite di rilevamento della PCR è risultato essere pari a (500 copie DNA/PCR).

Conclusioni: La procedura descritta potrebbe dare dei benefici nella diagnosi di laboratorio per *Nocardia* spp. In particolare nei casi di campioni negativi alla coltura e positivi al microscopio per forme alcool resistenti.

1. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, et al. Clinical and laboratory features of the nocardia spp. based on current molecular taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews* 2006;19:259-82.

2. Wehrhahn MC, Xiao M, Kong F, et al. A PCR-based intergenic spacer region-capillary gel electrophoresis typing method for identification and subtyping of *Nocardia* species. *J Clin Microbiol* 2012;50:3478-84.