

-25°C e processate entro 24h per l'estrazione del DNA con il metodo di estrazione di DNA da tessuti *High pure PCR Template Preparation Kit®* dalla Ditta ROCHE, che prevede digestione con *Proteinasi K®*, seguita da eluizione su colonne *High Pure Filter Tube®*. La PCR sugli eluati è stata eseguita utilizzando la DNA Polimerasi *AmpliTaq Gold®* della Ditta Applied Biosystem secondo il protocollo di amplificazione della regione spaziatrice 16S-23S del genere *Mycobacterium* indicato dal kit *INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 Amp®* della Ditta INNOGENETICS. I seguenti cicli termici sono stati eseguiti su termociclatore P.E. Cetus PE2400:

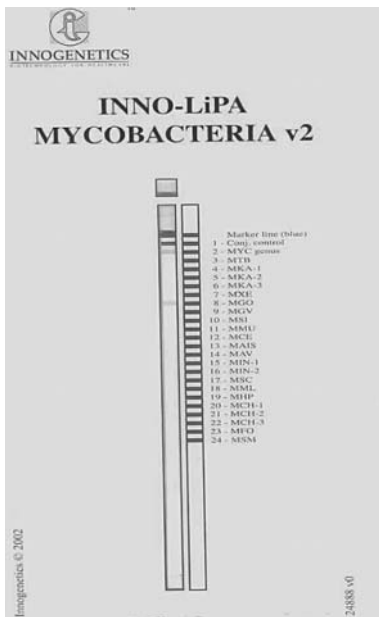
1. Denaturazione	95°C	1 min	} <u>40 volte</u>
2. Denaturazione	95°C	30 sec	
3. Appaiamento	62°C	30 sec	
4. Appaiamento	72°C	30 sec	
5. Hold	4°C	∞	

L'identificazione degli amplificati è stata effettuata con il metodo *INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2®* della Ditta INNOGENETICS, basato sul principio della ibridazione inversa: i prodotti dell'amplificazione sono stati biotinilati ed ibridati con sonde oligonucleotidiche immobilizzate su strisce di reazione, corrispondenti a 22 specie di *Mycobacterium*; altre 2 linee di controllo corrispondono rispettivamente al controllo di reazione del coniugato ed alla presenza del gene comune al genere *Mycobacterium*. L'ibridazione viene svelata dall'incubazione della striscia in presenza di streptoavidina legata a fosfatasi alcalina e successivamente dall'aggiunta del cromogeno.

**Risultati.** La presenza di DNA di *M. gordonae* nel campione è evidenziata dalla corrispondente linea di ibridazione inversa sulla striscia di reazione. (Fig.1)

**Discussione.** La ricerca tramite PCR di bacilli appartenenti al Genere *Mycobacterium* in campioni biotici intestinali, può contribuire a porre la diagnosi differenziale tra *M. di Crohn* e *Tubercolosi intestinale*. Nel caso in esame la coltura confermava dopo 21 giorni la presenza di *M. gordonae*. L'esperienza descritta suggerisce l'utilità di estendere la ricerca di Micobatteri anche a specie non comunemente coinvolte in processi intestinali, ricorrendo a metodi molecolari, altamente specifici e più sensibili rispetto ai metodi tradizionali.

Figura 1



190

**GENOTIPI DI VIRUS C IN UN CAMPIONE DI PAZIENTI AFFERENTI ALLA U.O. SEMPLICE DI MICROBIOLOGIA, P.O. CASTROVILLARI**

Venditti W., Bonifati A., Capano A., Di Vasto M., Maltese R., Vicchio T.

Unità Operativa di Microbiologia, P.O. Castrovillari (CS), Azienda Sanitaria N. 2

**Introduzione.** L'infezione da virus dell'epatite C rappresenta attualmente uno dei più importanti problemi di sanità pubblica a livello mondiale.

Il virus che causano l'epatite C costituiscono un gruppo che presenta sottotipi estremamente variabili. Lo studio del genotipo del virus HCV rappresenta un momento importante nella definizione epidemiologica e clinica dell'infezione. Il genotipo identifica la virulenza del ceppo infettante e consente di individuare categorie differenti di pazienti a cui applicare protocolli di trattamento antivirale differenziati. In Italia ed in Europa vi è una netta prevalenza del genotipo 1, ed in particolare del genotipo 1b.

**Materiali e metodi.** Nell'arco temporale 2003-2005 sono stati tipizzati i genotipi HCV di 211 pazienti, di cui 71 provenienti dal SERT e 140 ambulatoriali. L'RNA virale veniva estratto da campioni di siero la cui positività è stata rivelata mediante RT-PCR (Cobas Amplicor HCV, Roche) e genotipizzato mediante tecnica di ibridazione inversa su supporto solido (Versant HCV genotipo LiPA, Bayer).

**Risultati.** Il genotipo 1b è stato riscontrato nel 41% dei pazienti ambulatoriali e nel 6% dei pazienti provenienti dal SERT; il genotipo 1a rispettivamente nel 16 e 19% ; il 2a / 2c è stato riscontrato nel 5 e 43%; il 2a nel 10 e 1%; il 3a nel 26 e 25%; il 4 nel 2 e 7% .

**Conclusioni.** Il genotipo 1b è risultato essere, come ci si attendeva, il più frequente tra i pazienti ambulatoriali, i genotipi 2a e 4 i meno frequenti; nei pazienti afferenti al SERT è risultato essere più frequente il genotipo 2a/2c. In particolare lo studio del genotipo di HCV in questa ultima popolazione di pazienti, ad alto rischio di trasmissione del virus, rappresenta un utile marcatore di diffusione del virus, offrendo utili informazioni sulla modalità di selezione e circolazione dei genotipi virali.

191

**HPV: CONDIZIONE NECESSARIA MA NON SUFFICIENTE NELL'EZILOGIA DEL CANCRO DELLA CERVICE**

Venditti W.<sup>1</sup>, Bonifati A.<sup>1</sup>, Di Vasto M.<sup>1</sup>, Stigliano C.M.<sup>3</sup>, Caruso W.<sup>2</sup>, Fabrizio A.<sup>3</sup>, Schifino F.<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>U.O. semplice Microbiologia

<sup>2</sup>U.O. Anatomia Patologica

<sup>3</sup>U.O. Ginecologia Preventiva, P.O. Castrovillari (CS), Azienda Sanitaria N. 2

**Introduzione.** I papillomavirus sono virus a DNA a simmetria icosaedrica, mancanti di rivestimento pericapsidico. Dati biologici ed epidemiologici hanno portato a suddividere gli