

HPV in alto, medio e basso rischio oncogenico in base al rischio più o meno significativo nell'indurre la trasformazione neoplastica. Gli HPV ad alto rischio rappresentano la principale causa dell'insorgenza di tumori della cervice uterina. L'infezione da HPV ad alto rischio non conduce all'immediato sviluppo di neoplasie invasive in quanto nella maggior parte dei casi l'infezione si risolve da sola, in altri il virus rimane latente per lunghi periodi di tempo, fino anche 20-50 anni. Il picco di incidenza dell'infezione genitale nelle donne si evidenzia nelle fasce di età intorno ai 20 anni, invece la malattia neoplastica necessita di una fase di latenza e raggiunge la sua massima incidenza nelle donne con oltre i 40 anni di età. È evidente che nella eziopatogenesi tumorale sia necessaria la persistenza dell'infezione virale. Tuttavia come un'infezione produttiva sia in grado di diventare a lunga permanenza e/o quali fattori possano dare luogo a lesioni cervicali reversibili dipende verosimilmente dalle situazioni fisiologiche ed immunologiche di ciascuna donna.

**Metodi.** Il nostro studio effettuato in circa sei mesi di lavoro su pazienti afferenti al centro di Ginecologia Preventiva<sup>2</sup> età compresa tra i 16 -75 anni sottoposte a pap-test e a ricerca dell'HPV-DNA.

Il test utilizzato per il riconoscimento dell'infezione da HPV si basa sulla tecnica del branched-DNA con una amplificazione finale del segnale, il test non distingue i sottotipi di papillomi implicati, ma stratifica il rischio di sviluppo di cancro della cervice distinguendo gli HPV in alto e basso rischio oncogeno, fornisce inoltre informazioni circa la carica virale infettante.

**Risultati.** Su un totale di 305 pazienti il riscontro dell'infezione da HPV è stato di 76 positivi pari al 25% ed era correlato alle seguenti alterazioni citologiche:

PAP-NEGATIVO	40 pari al	52,5%
ASCUS	8 pari al	10,5%
L -SIL	13 pari al	17,1%
H -SIL	12 pari al	15,7% di cui 5 CIS

**Conclusioni.** La presenza di HPV alto rischio con pap-test negativo si è riscontrato in pazienti di età compresa tra 18 e 35 anni. HPV alto rischi con ascus ed l-sil, in pazienti di età compresa tra 35 e 42 anni.

HPV alto rischio con h-sil e ca microinvasivo in pazienti con età superiore ai 43 anni.

<sup>2</sup>Trattasi di centro di riferimento regionale di secondo livello

## 192

### VALUTAZIONE DELLA PERSISTENZA DI DIVERSI GENOTIPI DI HPV NEL FOLLOW-UP DI PAZIENTI TRATTATE PER LESIONI CERVICALI DI ALTO GRADO

Venturoli S.<sup>1</sup>, Ambretti S.<sup>1</sup>, Cricca M.<sup>1,2</sup>, Gallinella G.<sup>1</sup>, Manaresi E.<sup>1</sup>, Bonvicini F.<sup>1</sup>, Filippone C.<sup>1</sup>, Musiani M.<sup>1</sup>, Zerbini M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>D.M.C.S.S - Divisione di Microbiologia, Università di Bologna,  
<sup>2</sup>C.R.R.E.M. - Azienda Ospedaliera S.Orsola Malpighi;  
 Via Massarenti 9, 40138 Bologna

**Introduzione.** Molti studi di follow up su pazienti sottoposte a trattamento di conizzazione per lesioni cervicali di alto grado (CIN2/3, carcinoma invasivo) hanno dimostrato una elevata persistenza degli HPV ad alto rischio oncogeno (HR-

HPV) anche nei casi in cui la lesione è stata completamente rimossa. La persistenza del virus aumenta il rischio di recidiva della lesione.

Scopo del nostro studio è stato valutare la persistenza di HPV dopo conizzazione e la percentuale di clearance dei diversi genotipi. A tale scopo abbiamo impiegato il metodo di PCR combinato a genotipizzazione [Line Blot Assay-Roche (LBA)] nell'analisi di 35 pazienti con lesioni di alto grado.

**Metodi.** Trentacinque donne sottoposte a conizzazione per lesioni di alto grado e risultate positive per HR-HPV in Hybrid Capture II sono state selezionate per il nostro studio. Di tutte le pazienti è stato analizzato, impiegando il saggio di amplificazione e genotipizzazione PCR-LBA, il prelievo al momento del trattamento e un prelievo a 3-6 mesi. I risultati ottenuti con il metodo di tipizzazione LBA sono stati confrontati con quelli ottenuti con un metodo di tipizzazione ELISA home-made.

Di tutte le pazienti è stato osservato l'istologico su cono e lo stato dei margini al fine di valutare la corretta rimozione della lesione. Inoltre tali pazienti hanno mostrato un Pap test normale nel controllo a 3-6 mesi.

**Risultati.** Al momento del trattamento, i genotipi identificati con maggiore frequenza sono stati HPV16 (47%), HPV31 (12%) e HPV33 (12%), mentre il 25% delle pazienti analizzate ha mostrato un'infezione mista. Nel 44 % dei prelievi eseguiti a 3-6 mesi dal trattamento si è evidenziata una persistenza dell'infezione da HR HPV. La persistenza virale è risultata differente a seconda del genotipo, infatti le pazienti con infezione da HPV16 hanno evidenziato una clearance del 67%, contro il 47% di quelle interessate da altri genotipi ad alto rischio oncogeno (31-33-52-58).

**Conclusioni.** L'impiego di tecniche per la genotipizzazione di un ampio spettro di HPV, quali il metodo Line Blot Assay (Roche), permette di valutare la persistenza virale dopo trattamento chirurgico per lesioni di alto grado e di correlare la clearance virale ai diversi genotipi di HPV. La persistenza dell'infezione da HR-HPV in pazienti trattate per lesioni cervicali di alto grado e con citologia negativa rappresenta un importante fattore predittivo del rischio di recidiva.

## 193

### VALUTAZIONE DI UN SISTEMA DIAGNOSTICO AUTOMATIZZATO PER LO STUDIO MOLECOLARE DI INFEZIONI ERPETICHE DEL SISTEMA NERVOSO

Verzaro,S., Mancini,C., Nazzari,C., Latte,M.C., Fabri, G., Gaeta,A.

Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica,  
 Università degli Studi "La Sapienza", P.le A. Moro 5, 00185 Roma

**Introduzione.** I virus erpetici svolgono un ruolo importante nella eziopatogenesi di varie sindromi infettive a carico del sistema nervoso. Essi sono ritenuti responsabili sia di patologie acute del sistema nervoso centrale con liquor limpido, o meningoencefaliti, sia di sindromi post-infettive; inoltre il Cytomegalovirus e l'Herpes virus 6 sono stati correlati a patologie del sistema nervoso periferico quali la Sindrome di Guillain - Barré.

Negli ultimi anni i notevoli progressi ottenuti nella diagnosi virologica hanno rivoluzionato l'approccio clinico verso il paziente neurologico grazie all'impiego di protocolli diagno-

stici rivolti all'analisi genomica qualitativa e quantitativa. Scopo del nostro studio è stata la messa a punto di un sistema diagnostico che associa una tecnica di estrazione automatica di DNA ad un'amplificazione genica di tipo Real Time per l'analisi di campioni di liquido cerebrospinale.

**Metodi.** Sono stati analizzati 154 campioni di liquor prelevati da Febbraio 2005 a Febbraio 2006 da pazienti affetti da patologie acute e croniche del sistema nervoso afferenti al Policlinico "Umberto I" di Roma.

I campioni sono stati processati per l'estrazione degli acidi nucleici mediante un sistema automatico e il DNA ottenuto è stato sottoposto ad analisi mediante Real Time PCR di tipo Taq - Man per l'identificazione di HSV-1, HSV-2, EBV, HCMV, HHV6. Un sistema di PCR Nested è stato impiegato per l'identificazione di VZV.

**Risultati.** Dei campioni analizzati 118 (76.6%) sono risultati negativi ai virus erpetici testati e 36 (23.4%) positivi rispettivamente a: 11 VZV, 7 HSV-1, 4 HSV-2, 7 HHV6, 4 EBV, 1 EBV ed HSV-2, 1 VZV ed HHV6 e 1 HCMV ed EBV. Tempo di refertazione 3 ore dall'arrivo del campione clinico.

**Conclusioni.** Nel sistema da noi studiato l'automazione della fase di estrazione associata all'amplificazione di tipo Real Time ha permesso di ottenere risultati accurati con elevata rapidità di esecuzione ed aumento dell'efficienza diagnostica.

194

#### RILEVAZIONE MOLECOLARE DELLE RESISTENZE DI MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN CAMPIONI CLINICI

Zara F.<sup>1</sup>, Meacci F.<sup>2</sup>, D'Amato V.<sup>2</sup>, Troupioti P.<sup>3</sup>, Sarassi A.<sup>3</sup>, Brerra R.<sup>1</sup>, Pardini M.<sup>4</sup>, Orrù G.<sup>5</sup>, Ciusa M.L.<sup>5</sup>, Pagani L.<sup>1</sup>, Orefici G.<sup>4</sup>, Fattorini L.<sup>4</sup>, Oggioni M.R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sez. Microbiologia, Dip. SMEC, Università di Pavia, Via Brambilla 74, 27100 Pavia

<sup>2</sup>La.M.M.B., Dip. Biologia Molecolare, Università di Siena, Policlinico Le Scotte, Via Bracci, 53100 Siena

<sup>3</sup>AOV Azienda Ospedaliera Valtellina e Valchiavenna Presidio di Sondalo, Via Zubiani 33, 23039 Sondalo,

<sup>4</sup>Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma,

<sup>5</sup>O.B.L., Università di Cagliari, Via Binaghi 4, 09121 Cagliari.

**Introduzione.** La selezione di mutanti di resistenza ad isoniazide e rifampicina è generalmente la causa di fallimenti terapeutici e del prolungato decorso clinico delle infezioni da *Mycobacterium tuberculosis*.

Pertanto sono necessari metodi molecolari utili ad una rapida rilevazione di tali mutazioni.

**Metodi.** 103 escreti, raccolti da 103 pazienti ospedalizzati ed ambulatoriali presso l'Azienda Ospedaliera di Sondalo nel periodo gennaio 2005 - gennaio 2006, sono stati decontaminati con NALC-NaOH e valutati mediante esame batterioscopico, coltura in Lowenstein-Jensen e MGIT 960. L'analisi molecolare è stata effettuata, dopo valutazione dell'idoneità del campione, con PCR qualitativa con target IS6110, real time PCR con sonde lineari FRET e tipizzazione con MIRU. L'antibiogramma per farmaci di seconda scelta è stata eseguito secondo protocolli standard.

**Risultati.** Con i metodi molecolari, la mutazione *katG315*

associata alla resistenza ad isoniazide è stata rilevata nel 15,4% dei campioni analizzati e nel 22,3% dei casi è stata evidenziata la mutazione *rpoB531* responsabile della rifampicina-resistenza. In 4 campioni la PCR real time sul gene *rpoB* ha evidenziato una popolazione mista (allele wild type e allele mutato).

I metodi molecolari e fenotipici hanno dato risultati sovrapponibili nel 97,4% dei casi per la resistenza ad isoniazide e nel 96% dei casi per la resistenza a rifampicina.

**Conclusioni.** L'analisi dei risultati ottenuti evidenzia una ottima concordanza tra i dati clinici, microbiologici e le caratterizzazioni molecolari, mostrando che l'approccio integrato colturale e molecolare può essere un utile strumento per la valutazione clinica e la gestione del paziente con tubercolosi.

195

#### INFEZIONE DA H. PYLORI: RUOLO DELLE INDAGINI MICROBIOLOGICHE ED ESPERIENZA SULLA SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI

Basaglia G.<sup>1</sup>, Cannizzaro R.<sup>2</sup>, Sperandio P.<sup>1</sup>, Stocco Calzavara S.<sup>1</sup>, Pancino A.<sup>1</sup>, Fornasari M.<sup>2</sup>, Lacchin T.<sup>2</sup>, De Paoli P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UO di Microbiologia, Immunologia e Virologia

<sup>2</sup>UO di Gastroenterologia Oncologica

Centro di Riferimento Oncologico, Istituto Nazionale Tumori, IRCCS, Via Pedemontana Occ., 12, 33081 Aviano (Pordenone).

**Introduzione.** L'infezione da *Helicobacter pylori* è stata negli anni studiata sotto vari aspetti. E' ben nota la sua associazione con gastrite cronica, ulcera duodenale e gastrica, adenocarcinoma e MALT linfoma gastrici. Le indagini microbiologiche svolgono per questa infezione un ruolo importante sia dal punto di vista diagnostico che di ricerca (ruolo e indicazioni sono stati ripresi anche dal recente *Maastricht 3 Consensus Report*, 2005). Molti di questi aspetti sono stati da noi studiati e pubblicati. Nel controllo delle patologie associate riveste grande importanza la sensibilità di *H. pylori* agli antibiotici. Scopo del presente studio è di raccogliere tutti i dati sugli antibiogrammi eseguiti nel nostro Laboratorio per offrire un quadro epidemiologico in riferimento ai pazienti seguiti nel nostro Istituto.

**Metodi.** Sono stati studiati i ceppi isolati, nell'arco di 8 anni (1998-2006), da 123 pazienti afferenti all'UO di Gastroenterologia Oncologica del nostro Istituto sintomatici per patologia *H. pylori* associata o soggetti a rischio per lesioni neoplastiche. L'antibiogramma è stato eseguito con E-test per metronidazolo, claritromicina e amoxicillina e, negli ultimi 2 anni, per tetraciclina e levofloxacina.

**Risultati.** La percentuale delle resistenze per paziente è risultata: metronidazolo 59.8% (73/122), claritromicina 52.8% (65/123), amoxicillina 0% (0/122), tetraciclina 0% (0/51) e levofloxacina 24% (12/50).

**Conclusioni.** La nostra casistica rileva per metronidazolo e claritromicina percentuali elevate di resistenza, per levofloxacina tali percentuali sono più contenute e non sono rilevate invece per amoxicillina e tetraciclina. I dati trovano riscontro con quanto riportato in Letteratura. Per quanto riguarda in particolare le elevate percentuali relative a metronidazolo e claritromicina queste sono giustificabili tenendo