

**P152****SVILUPPO DI UN SAGGIO DI REAL-TIME PCR PER LA QUANTIFICAZIONE DEL DNA DI HPV IN CAMPIONI CITOLOGICI CERVICALI**

Ambretti S., Venturoli S., Cricca M., Filippone C., Delbarba S., Manaresi E., Musiani M., Zerbini M.

*Dip. di Medicina Clinica, Specialistica e Sperimentale, Sez. di Microbiologia, Università di Bologna, Via Massarenti 9, 40138 Bologna.*

L'infezione da Papillomavirus Umani (HPV) ad alto rischio oncogeno costituisce un importante fattore di rischio per l'insorgenza di lesioni displastiche a livello della cervice uterina e per la progressione in senso neoplastico di tali lesioni. Negli ultimi anni è emersa la necessità di valutare l'associazione fra carica virale e storia naturale delle lesioni cervicali HPV-correlate. A questo scopo abbiamo messo a punto un saggio di Real Time PCR, in formato Sybr Green, in grado di quantificare il DNA di HPV presente in campioni citologici cervicali e di fornire un risultato normalizzato per numero di cellule grazie alla quantificazione del gene housekeeping gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi (GAPDH).

Per l'identificazione di un ampio numero di HPV rilevabili in lesioni premaligne, abbiamo studiato un pool di primer di consenso che consente l'amplificazione di un frammento della regione L1 del DNA di 8 importanti genotipi mucosi ad alto rischio oncogeno (16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58) e dei 2 principali genotipi a basso rischio (6, 11). Il saggio consente non solo la quantificazione del DNA di HPV ma anche la genotipizzazione mediante analisi delle curve di melting.

Il GAPDH viene amplificato in una reazione separata da una coppia di primer specifici. La quantificazione di un gene housekeeping permette di effettuare una valutazione del DNA di HPV che tenga conto della variabilità per numero di cellule dei campioni in esame.

Per la validazione della tecnica sono stati utilizzati per per l'HPV plasmidi contenenti la regione L1 del DNA dei 10 genotipi studiati, per il GAPDH DNA genomico umano.

Il saggio è stato quindi utilizzato per analizzare 30 campioni citologici cervicali provenienti da donne con lesioni di diverso grado (ASCUS, LSIL, HSIL). I risultati indicano come la Real-Time PCR da noi sviluppata sia una tecnica altamente sensibile e riproducibile e possa quindi essere utile nello studio della correlazione fra carica virale e rischio di progressione neoplastica.

**P153****DIAGNOSI DI INFEZIONE DA VIRUS DELL'APPARATO RESPIRATORIO: TRE METODI A CONFRONTO.**

Arcangeletti M.C., De Conto F., Pinardi F., Medici M.C., Valcavi P., Casula F., Ferraglia F., Motta F., Covan S., Calderaro A., Chezzi C., Dettori G..

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

**Obiettivi**

Obiettivo principale di questo studio è quello di individuare, nell'ambito delle indagini di laboratorio considerate, quella maggiormente efficace per il rilevamento di virus dell'appa-

rato respiratorio.

**Materiali e Metodi**

Le indagini virologiche condotte presso l'Unità di Virologia (Sezione di Microbiologia) di Parma, si riferiscono a 3260 campioni clinici costituiti da secrezioni respiratorie, prelevate a mezzo di tampone o mediante aspirazione ed analizzate in un arco di tempo di 5 anni (1999-2003).

L'immunofluorescenza è stata impiegata sia direttamente sulle cellule esfoliate presenti nel campione, che previo inoculo dello stesso in colture cellulari allestite su vetrino ed incubate per 18-24 ore (esame colturale rapido). In parallelo, i campioni sono stati inoculati in colture cellulari per mettere in evidenza la presenza di agente/i citopatogeno/i (esame colturale tradizionale).

**Risultati**

La valutazione comparativa dei risultati ottenuti mediante la ricerca di proteine virus-specifiche nelle cellule esfoliate del campione o previo esame colturale rapido, come anche di quelli ricavati attraverso l'esame colturale tradizionale, ha messo in evidenza sostanziali differenze nell'efficacia di rilevamento virale, dipendentemente dalla specie virale in causa. In particolare, l'immunofluorescenza applicata al campione, i cui risultati sono disponibili nell'ambito della stessa giornata di arrivo del campione stesso, sembra essere il metodo di scelta per il virus respiratorio sinciziale, che a sua volta rappresenta il virus più frequentemente riscontrato nei campioni clinici e quello maggiormente in causa nelle infezioni nosocomiali, mentre risulta pressoché inefficace per adenovirus e per i virus influenzali e parainflenzali. Per il primo, l'esame colturale tradizionale è quello che garantisce i migliori risultati, mentre per le due ultime categorie di virus, l'esame colturale rapido appare come il metodo di scelta.

**Considerazioni conclusive**

Una scelta mirata delle indagini virologiche, oltre a garantire un valido supporto per il clinico, può permettere, al contempo, l'attuazione di eventuali misure di profilassi, atte ad evitare l'insorgenza e/o la diffusione di infezioni nosocomiali.

**P154****METODI TRADIZIONALI E MOLECOLARI A CONFRONTO NELLA DIAGNOSI DI INFEZIONE VIRALE**

Arcangeletti M.C., De Conto F., Pinardi F., Medici M.C., Valcavi P., Casula F., Ferraglia F., Motta F., Covan S., Calderaro A., Chezzi C., Dettori G..

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

**Obiettivi**

E' stata valutata l'efficacia della microscopia elettronica, dell'esame colturale convenzionale e di metodi molecolari avanzati nella diagnosi delle infezioni virali.

**Materiali e Metodi**

Le indagini virologiche condotte presso l'Unità di Virologia (Sezione di Microbiologia) di Parma, si riferiscono a 5032 campioni clinici, di cui 2288 feci, 115 urine (per la ricerca di virus BK), 2377 tamponi faringei, 252 liquor, analizzati in un arco di tempo di circa 3 anni, dal gennaio 2001 al febbraio 2004. Tutti i campioni sono stati sottoposti ad esame colturale tradizionale. La microscopia elettronica (ME) è stata impiegata quale metodo rapido direttamente sugli estratti fecali e sui campioni di urina, come anche per l'identifica-