

Valutazione della fase pre-analitica e post-analitica nell'era della diagnosi molecolare delle malattie sessualmente trasmesse: controllo di cellularità e controllo interno

Loria Bianchi, Zaleida Napoli, Simona Turrisi, Swan Donati, Riccardo Lari

U.O. Laboratorio Analisi, Sezione Microbiologia, Ospedale "San Jacopo", Pistoia, Italy

Summary

Pre-analytical and post-analytical evaluation in the era of molecular diagnosis of sexually transmitted diseases: cellularity control and internal control.

Background. Increase of molecular tests performed on DNA extracted from various biological materials should not be carried out without an adequate standardization of the pre-analytical and post-analytical phase.

Materials and Methods. Aim of this study was to evaluate the role of internal control (IC) to standardize pre-analytical phase and the role of cellularity control (CC) in the suitability evaluation of biological matrices, and their influence on false negative results. 120 cervical swabs (CS) were pre-treated and extracted following 3 different protocols. Extraction performance was evaluated by amplification of: IC, added in each mix extraction; human gene HPRT1 (CC) with RT-PCR to quantify sample cellularity; L1 region of HPV with SPF10 primers. 135 urine, 135 urethral swabs, 553 CS and 332 ThinPrep swabs (TP) were tested for *C. trachomatis* (CT) and *U. parvum* (UP) with RT-PCR and for HPV by endpoint-PCR. Samples were also tested for cellularity.

Results. Extraction protocol with highest average cellularity (A₀)/sample showed lowest number of samples with inhibitors; highest HPV positivity was achieved by protocol with greatest A₀/PCR. CS

and TP under 300.000 cells/sample showed a significant decrease of UP (P<0.01) and HPV (P<0.005) positivity. Female urine under 40.000 cells/mL were inadequate to detect UP (P<0.05).

Conclusions. Our data show that IC and CC allow optimization of pre-analytical phase, with an increase of analytical quality. Cellularity/sample allows better sample adequacy evaluation, crucial to avoid false negative results, while cellularity/PCR allows better optimization of PCR amplification. Further data are required to define the optimal *cut-off* for result normalization.

Introduzione

Un campo in cui la biologia molecolare ha avuto un ampio sviluppo è quello della diagnostica delle Malattie Sessualmente Trasmesse (MST), causate da batteri quali *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum* e virus come il Papilloma Virus Umano (HPV). Sono più di 340 milioni i casi di infezione stimati ogni anno nel mondo (43); se non trattati, possono evolvere in gravi complicanze, quali il cancro della cervice uterina (HPV), infertilità, aborti precoci e malattie neonatali di grado severo (15, 18, 32, 44). Le tecniche di amplificazione degli acidi nucleici (NAATs) sono il *gold standard* per *C. trachomatis* (25, 33) e HPV (29) e stanno diventando tali anche per lo *screening* di *Ureaplasma* spp, in quanto in grado di discriminare tra le due specie *U. parvum* e *U. urealyticum* e in grado di dare indicazioni sulla carica, importante per definire il *cut-off* di trattamento (4) e gestire il *follow-up* del paziente. L'evoluzione tecnologica dell'ultimo decennio ha permesso di passare da metodiche NAATs manuali o semiautomatiche a metodiche completamente automatiche come la Real Time (RT)-PCR, che ha permesso di rispondere ai requisiti di efficienza (automazione) ed efficacia (rapidità di risposta) necessari per la gestione del paziente. Infatti questa tecnologia presenta elevata sensibilità, versatilità di applicazione (matrici diverse, prelievo unico per più patogeni) e ridotto *Turn Around Time* (TAT). Punto cardine per aumentare l'efficacia e l'efficienza della diagnostica molecolare è la standardizzazione della fase pre-analitica in tutte le sue componenti: i) tipologia e modalità di prelievo; ii) pre-trattamento del campione; iii) fase estrattiva, in quanto la qualità dei dati forniti dipende dall'ottimizzazione di queste tre fasi (13). La valutazione dell'idoneità del prelievo è il primo *step* della fase pre-analitica da determinare (8), in quanto un preparato non idoneo inficia il risultato ottenuto, indipendentemente dalla metodica di laboratorio impiegata. L'idoneità del campione dipende: dalla tipologia di prelievo impiegato, dalla tecnologia di allestimento del preparato (nel caso di pap-test e batterioscopico Gram) e dal pretrattamento e modalità di estrazione del DNA/RNA (nel caso delle tecnologie NAATs). Nello *screening* del cervicocarcinoma effettuato con il pap-test (2) l'adeguatezza del prelievo ha un ruolo cruciale, ed è definita dal Bethesda System 2001 dalla presenza di entrambe le popolazioni cel-

Correspondence: Loria Bianchi, U.O. Laboratorio Analisi, Sezione Microbiologia, Ospedale "San Jacopo", Via Ciliegiole 97, 51100 Pistoia, Italy. Tel.: +39.0573.351925.

E-mail: l.bianchi@usl3.toscana.it

Key words: microbiological molecular tests, cellularity quantification, sample suitability.

Contributions: the authors contributed equally.

Conflict of interests: the authors declare no potential conflict of interests.

©Copyright L. Bianchi et al., 2014
Licensee PAGEPress, Italy
Microbiologia Medica 2014; 29:4718
doi:10.4081/mm.2014.4718

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License (by-nc 3.0) which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

lulari endo/ecto cervicali (indice del fatto che la zona di trasformazione, zona preferenziale per l'ingresso del virus HPV, è stata campionata) (17).

Tuttavia, con l'avvento dei test molecolari, l'idoneità del campione è diventata discrezionale, o quantomeno non codificata da linee guida scientifiche. All'inizio dell'introduzione delle metodiche NAATs per la ricerca dei patogeni cervicali, la problematica dell'idoneità del prelievo è stata affrontata solo per *C. trachomatis*, e successivamente abbandonata del tutto (6, 20, 22, 42). L'approccio molecolare per la ricerca dell'HPV, patogeno con tropismo simile a *C. trachomatis*, è stato completamente diverso. Per anni il test HPV è stato eseguito senza una valutazione dell'idoneità del campione, comunque stimata indirettamente dalla lettura del pap-test eseguito in contemporanea. Con l'introduzione degli algoritmi che prevedono l'inserimento del test HPV sia nello *screening* primario che secondario del cervicocarcinoma, sono venuti a mancare studi sistematici e linee guida condivise che tengano conto dell'adeguatezza del prelievo cervicale. Sono infatti quasi inesistenti lavori che valutano l'impatto dei parametri pre-analitici (modalità di prelievo, pre-trattamento ed estrazione del DNA) sulla qualità analitica dei risultati ottenuti e per i quali fondamentali sono i due controlli: controllo interno (IC) e controllo di cellularità (CC) (8).

Questo diverso approccio fra la diagnostica molecolare per la ricerca di *C. trachomatis* ed HPV è rispecchiato anche nella diversa presenza di questi due controlli nei kit commerciali. Nei NAATs per la ricerca di *C. trachomatis* dell'ultimo decennio la cellularità del campione non viene nemmeno approcciata, in quanto privi del controllo endogeno umano (CC), mentre viene valutata la presenza di inibitori mediante l'impiego dell'IC (7). Al contrario, la maggior parte dei NAATs per la ricerca di HPV presenta il CC per la valutazione qualitativa della cellularità ma non presenta l'IC per la valutazione di inibitori parziali (29), ad eccezione di alcuni kit in RT-PCR (Dx HR-HPV Auto Assay, Biorad; Realline HPV High Risk Genotype Fla-Format, Bioron) e microarray (PAPILLOCHECK HPV Screening Test, Greiner) che presentano entrambi i controlli. Praticamente inesistenti sono comunque lavori che riportano dei *cut-off* di cellularità che definiscano l'idoneità del prelievo e spesso i valori di cellularità riportati non sono espressi come numero assoluto di cellule, ma come unità di misura relative alla metodica usata (10, 12, 14, 16, 39). Le stesse linee guida dei requisiti di un test HPV per lo *screening* primario del cervicocarcinoma (24) non menzionano niente riguardo l'idoneità del prelievo e il test Hybrid Capture II (Qiagen, Germania), con cui sono stati condotti tutti gli studi che hanno dimostrato l'importanza dell'inserimento della ricerca dell'HPV nello *screening*, non ha un CC (31).

Diversi sono invece i lavori in letteratura che valutano l'influenza dell'arricchimento del pellet mediante centrifugazione dei tamponi cervicali per la citologia su strato sottile (ThinPrep, SurePath) per aumentare la sensibilità del test molecolare rispetto all'estrazione diretta del DNA (5, 12, 35), mentre praticamente inesistenti sono lavori che valutino l'idoneità del prelievo eseguito con i tamponi E-Swab (Copan, Italia), i più utilizzati attualmente nelle microbiologie perché adatti all'esecuzione automatizzata degli esami culturali. Inesistenti sono anche lavori condotti con metodiche NAATs che quantificano la carica definendo dei *cut-off* per il trattamento dei patogeni commensali opportunisti (*Ureaplasma spp.*), importanti per un *follow-up* del paziente più appropriato come dimostrato con le metodiche culturali/microscopiche (4).

Gli scopi di questo studio sono stati: i) valutare l'influenza delle varie fasi del processo *pre-analitico* (tipologia di prelievo, pre-trattamento, estrazione) sulla *performance* delle metodiche NAATs per la rilevazione delle principali MST, mediante l'impiego dell'IC e del CC, e valutare l'importanza della messa a punto e del monitoraggio dell'intero processo pre-analitico a monte, al fine di incrementare la qualità del dato analitico fornito e semplificare/ottimizzare il *work-flow* di laboratorio; ii) standardizzare la fase *post-analitica* mediante inserimento nel referto della cellularità del campione e della carica del patogeno rilevato, importante per il trattamento e il *follow-up* del paziente.

Materiali e Metodi

Popolazioni allo studio e pre-trattamento dei campioni

Ottimizzazione della fase pre-analitica

Il processo di messa a punto della fase di pre-trattamento e di estrazione è stato eseguito su un totale di 120 campioni cervicali: 60 eseguiti con brush e contenitore E-Swab (CS), e 60 eseguiti con cytobrush, spatola di Ayre e contenitore ThinPrep (TP), di cui 30 risultati negativi e 30 positivi all'analisi per la presenza di HPV 16 mediante metodica AMPLI-QUALITY HPV-TYPE EXPRESS v2.0 (Ab Analitica, Italia); questi ultimi presentavano un C_t (cycle threshold, ciclo al quale ha inizio la fase esponenziale dell'amplificazione) superiore a 32 quando testati mediante metodica RT-PCR *home made* diretta verso la regione E6 del virus (27).

Tre sono i protocolli analizzati per i 60 TP: A) protocollo $A_{ThinPrep}$ (tempo di esecuzione, TE=5 ore) che prevede: i) una fase di centrifugazione di 2 mL di campione per 15 min a 8000 rpm; ii) una fase di digestione del pellet (risospeso in 190 μ L di buffer di lisi G2 e 10 μ L di proteinasi K) a 56°C per 4 h; iii) una fase di estrazione, effettuata con kit Tissue DNA (Qiagen); B) protocollo $B_{ThinPrep}$ (TE=55 min) che prevede: i) una fase di centrifugazione come descritta al punto primo del protocollo A; ii) una fase di risospensione del pellet in 400 μ L di buffer di lisi ATL; iii) una fase di estrazione con kit Virus Mini (Qiagen) dove la digestione con proteinasi K del campione avviene in automatico sull'estrattore; C) protocollo $C_{ThinPrep}$ (TE=45 min) che prevede un'unica fase estrattiva a partire da 400 μ L di soluzione TP senza pellettamento effettuata con kit Virus Mini (Qiagen).

Due sono i protocolli analizzati per i 60 CS: A) protocollo A_{Swab} (TE=5 h) che prevede: i) una fase di centrifugazione di 0.8 mL di campione per 15 min a 8000 rpm; ii) una fase di digestione del pellet con proteinasi K; iii) una fase di estrazione come nel protocollo $A_{ThinPrep}$; B) protocollo B_{Swab} (TE=45 min) che prevede un'unica fase estrattiva effettuata su 200 μ L di campione con aggiunta di 200 μ L di buffer ATL, con kit Virus Mini (Qiagen). Tutti e 5 i protocolli sono stati eseguiti su estrattore automatico EZ1-Advanced BioRobot (Qiagen).

Valutazione dell'adeguatezza del prelievo

Millecentocinquantacinque (1155) campioni, di cui 135 urine (90 maschi e 45 femmine), 135 tamponi uretrali (106 maschi e 29 femmine), 553 CS e 332 TP, sono stati analizzati per valutare l'adeguatezza del prelievo, per la scelta dei *cut-off* di cellularità e per la standardizzazione della carica batterica. I campioni di urine sono stati pre-trattati nel seguente modo: centrifugazione di 10 mL per 5 min a 4000 rpm; eliminazione del surnatante e risospensione dei restanti 1-2 mL; trattamento di 200 μ L di sospensione con protocollo B_{Swab} , come i CS e i tamponi uretrali. I TP sono stati estratti secondo quanto descritto nel protocollo $B_{ThinPrep}$, utilizzando 10 mL di campione.

Valutazione della cellularità dopo il suo inserimento in referto

Per valutare eventuali ricadute sulla qualità del dato analitico dell'inserimento del CC in sede di refertazione, è stata selezionata in maniera casuale una popolazione di 327 soggetti (256 CS, 27 tamponi uretrali e 44 urine), afferenti al laboratorio di Microbiologia dell'Azienda USL 3 di Pistoia per diagnosi di MST; i valori di cellularità ottenuti sono stati confrontati con le cellularità ottenute per la stessa tipologia di prelievo nella popolazione 2 precedentemente descritta.

Estrazione del DNA

Per tutti e 5 i protocolli descritti, per ogni campione è stata preparata una mix di estrazione composta da: 10 μ L di IC relativo a *C. trachomatis* e/o 10 μ L di IC relativo a *Ureaplasma spp* + 3.6 μ L di RNA Carrier

(Qiagen) + Buffer AVE (Qiagen) fino ad un volume finale di 60 μ L. In ogni seduta è stato estratto anche un controllo negativo (NC) contenente esclusivamente 200/400 μ L di acqua. Il DNA di tutti i campioni analizzati è stato eluito in un volume di 60 μ L e conservato a -20° C fino all'analisi.

Quantificazione del numero di cellule

Per la quantificazione delle cellule presenti in ciascuno dei campioni analizzati è stato utilizzato il kit Cell Control r-gene (Biomérieux, Francia), metodica in RT-PCR quantitativa che amplifica una porzione del gene umano codificante per l'enzima ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi 1 (HPRT1). Ogni seduta è stata validata analizzando il coefficiente di correlazione ($R^2 \geq 0.99$) e l'efficienza di reazione ($0.90 \leq \text{eff} \leq 1.1$) della curva standard generata mediante amplificazione di 3 standard a concentrazione nota.

Rivelazione di *C. trachomatis* e *Ureaplasma* spp

Per la ricerca di *U. parvum* il DNA estratto è stato amplificato mediante il kit *U. Parvum/Urealyticum* Real Time (Nuclear Laser Medicine, Italia), mentre per la rilevazione di *C. trachomatis* è stato utilizzato il kit Artus *C. trachomatis* Plus RG PCR (Qiagen), che prevede l'amplificazione contemporanea di due regioni target: una regione genomica all'interno del gene MOMP (106 pb) e una regione del plasmide criptico (111 pb). Amplificazione ed interpretazione dei risultati sono state eseguite seguendo le istruzioni riportate sui rispettivi manuali. Valori di C_t relativi all'amplificazione dell'IC >27 per *C. trachomatis* e >30 per gli *Ureaplasma* spp. sono stati considerati indice della presenza nel campione di inibitori parziali o totali.

Ricerca e genotipizzazione del Papilloma Virus Umano

La metodica utilizzata è una metodica PCR end-point con genotipizzazione su striscia ed ibridazione inversa (AMPLIQUALITY HPV-TYPE EXPRESS v2.0, Ab Analitica). Amplificazione, rivelazione ed interpretazione dei risultati è stata effettuata seguendo le istruzioni del manuale.

Quantificazione della carica di Papilloma Virus Umano 16

I 60 TP della popolazione 1 sono stati scelti selezionando 30 campioni HPV negativi e 30 campioni positivi ad HPV 16 a bassa carica ($C_t \geq 32$, corrispondente ad una concentrazione virale inferiore a 10 copie/ μ L). La determinazione della carica nei campioni positivi è stata effettuata con

il metodo di RT-PCR come descritto da *Peitsaro e collaboratori* (27). Per quantificare la carica è stato utilizzato lo standard internazionale WHO per l'HPV16 a concentrazione nota (NIBSC code: 06/202). La specificità degli amplificati è stata verificata tramite analisi della curva di *melting*.

Metodi colturali

Per correlare il C_t con la carica del campione, 60 CS, estratti secondo il protocollo B_{swab} e risultati positivi in RT-PCR ad *Ureaplasma* spp, sono stati analizzati dopo semina su AGAR A7 (bioMérieux) mediante lettura delle colonie al microscopio ottico.

Risultati

Ottimizzazione della fase pre-analitica

I valori di cellularità medi ottenuti nei 60 CS e nei 60 TP sottoposti alle diverse modalità di pre-trattamento ed estrazione sono illustrati in Tabella 1. Per i CS il protocollo estrattivo a resa più alta è risultato il B_{swab} ($2.762.379 \pm 328.067$ cellule/prelievo), mentre per i TP è risultato il protocollo C_{ThinPrep} , con una cellularità media/prelievo di 1.871.093 e assenza di campioni inibiti. Tuttavia, i campioni estratti secondo il protocollo C_{ThinPrep} presentano una cellularità media/PCR circa 3 volte più bassa (6.237 cellule/PCR); la cellularità media/PCR più alta è stata misurata nel protocollo B_{ThinPrep} , in relazione al quale viene misurato anche il numero più alto di campioni positivi. Il numero di campioni positivi rilevati con il protocollo C_{ThinPrep} è inferiore rispetto al numero di campioni positivi rilevati con gli altri due protocolli.

Valutazione dell'adeguatezza del prelievo

I valori di cellularità medi ottenuti nei 1155 campioni sono illustrati nella Tabella 2; il *cut-off* scelto, riportato in Tabella, equivale a circa il 10% della numerosità cellulare media ottenuta per quel tipo di campione. La cellularità media massima è stata ottenuta nei CS, circa il doppio rispetto alla cellularità riscontrata nei TP, mentre i campioni a densità cellulare più bassa sono le urine. Per valutare un'eventuale differenza nella distribuzione delle frequenze dei patogeni in relazione alla cellularità del campione, sono state confrontate le positività a *C. trachomatis* ed HPV (patogeni intracellulari) e a *U. parvum* (patogeno di superficie ad alta frequenza) nei campioni considerati idonei e non idonei a vari livelli di *cut-off*. Per i CS, i tamponi uretrali e i TP sono

Tabella 1. Valutazione dell'efficacia del pretrattamento dei tamponi cervicali mediante comparazione dei valori di cellularità media ottenuti nelle diverse modalità di estrazione, del numero di campioni contenenti inibitori e della resa di estrazione (comparata con la modalità di estrazione a cellularità più alta).

Tamponi E-swab	Protocollo A_{swab}	Protocollo B_{swab}	P-value	
Cellularità/prelievo	912.185 \pm 218.643	2.762.379 \pm 328.067	P<0.0005	
Cellularità/PCR	63.346 \pm 15.183	38.366 \pm 4556		
Numero campioni inibiti	13	5	P<0.05	
Resa media	33%	100%		
Tamponi ThinPrep	Protocollo A_{ThinPrep}	Protocollo B_{ThinPrep}	Protocollo C_{ThinPrep}	P-value
Cellularità/prelievo	985.643 \pm 172.390	1.296.026 \pm 392.980	1.871.093 \pm 271.437	A vs B non significativo
Cellularità/PCR	16.427 \pm 2873	21.600 \pm 6550	6237 \pm 905	B vs C, P<0.01
Numero campioni inibiti	7	6	0	A vs C, P<0.0005
Numero campioni HPV 16 positivi	23	24	25	
Numero campioni HPV 16 positivi dopo diluizione e riestrazione	26	30	-	
Resa media	53%	69%	100%	

state confrontate le positività considerando tre *cut-off*: 200.000 cellule/prelievo, 300.000 cellule/prelievo e 400.000 cellule/prelievo.

Nei CS non è stata rilevata alcuna differenza statisticamente significativa della positività a *C. trachomatis* per nessuno dei *cut-off* proposti; tuttavia si osserva un abbassamento della frequenza nei campioni posti al di sotto del *cut-off* di 300.000 cellule/prelievo (Figura 1A).

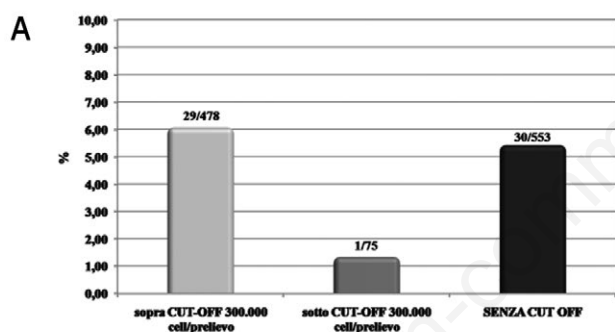
Per *U. parvum* è stata rilevata una differenza statisticamente significativa sopra e sotto il *cut-off* di 300.000 cellule/prelievo ($P < 0.01$) e di 200.000 cellule/prelievo ($P < 0.005$, Figura 1B).

Anche nei TP è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa ($P < 0.005$) della positività al virus HPV nei campioni al di sopra e al di sotto del *cut-off* di 300.000 cellule/prelievo (Figura 1C). Non è stata riscontrata alcuna differenza significativa nella distribuzione della frequenza di positività a *C. trachomatis* nei campioni uretrali, ed a *U. parvum* nei tamponi uretrali e nelle urine dei soggetti maschi (Figura 1D).

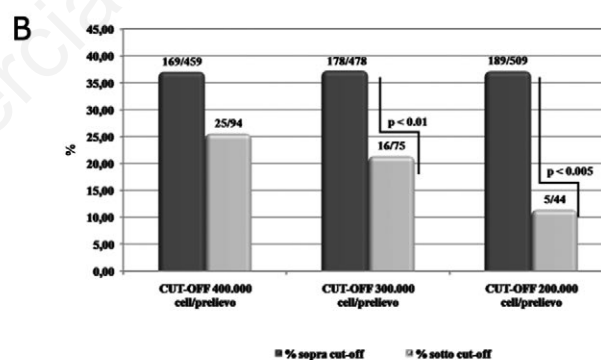
Tuttavia, questi ultimi mostrano una tendenza ad avere una positività più bassa quando caratterizzati da una cellularità al di sotto del

Tabella 2. Valori di cellularità media (C_m), deviazione standard (DS), errore standard (ES) e intervallo di confidenza (IC) al 95% ottenuti per ogni tipo di campione.

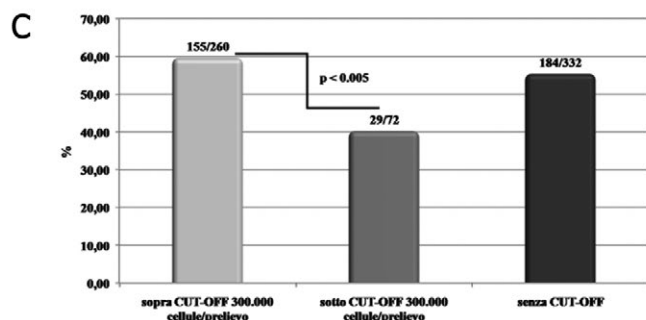
	C _m	DS	ES	IC 95%	Cut-off	Sotto al cut-off (%)
A (cellule/prelievo)						
ThinPrep	1.064.818	1.496.830	82.149	1.064.818±164.298	300.000	21.69
Tampone cervicale	2.374.711	3.667.557	155.960	2.374.711±311.921	300.000	13.56
Tampone uretrale	1.684.616	2.263.557	194.816	1.684.616±389.632	300.000	14.81
Urine (cell/mL)	396.495	701.471	60.373	396.495±120.746	40.000	26.67
B (cellule/PCR)						
ThinPrep	88.734	124.736	6.846	88.734±13.692		
Tampone cervicale	39.578	61.126	2.599	39.578±5.199		
Tampone uretrale	28.077	37.726	3.247	28.077±6.494		
Urine (cell/mL)	6.608	11.691	1.006	6608±2012		



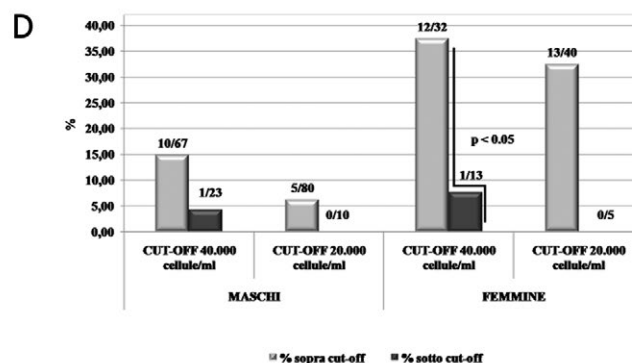
* I valori di p vengono riportati solo se significativi



* I valori di p vengono riportati solo se significativi



* I valori di p vengono riportati solo se significativi



* I valori di p vengono riportati solo se significativi

Figura 1. Positività a *C. trachomatis* (A) ed a *U. parvum* (B) nei tamponi cervicali E-swab: variazione della positività sopra e sotto il *cut-off* di cellularità scelto. C) Positività a HPV: variazione in relazione alla scelta del *cut-off* nei campioni ThinPrep. D) Positività a *U. parvum*: variazione in relazione alla scelta del *cut-off* nei campioni di urine. Sull'asse delle ordinate sono riportate le frequenze; per ogni gruppo sono riportati i numeri di casi positivi/casi totali.

cut-off di 40.000 cellule/mL, rispetto ai campioni con cellularità maggiore (14.9% vs 4.3%); nei campioni con cellularità inferiore alle 20.000 cellule/prelievo nessun patogeno è stato rilevato. I campioni di urine delle femmine, invece, mostrano una differenza statisticamente significativa nella frequenza di positività a *U. parvum* al di sopra e al di sotto del cut-off di 40.000 cellule/prelievo. Per quanto concerne la positività a *C. trachomatis*, essendo soltanto uno il campione positivo rilevato in questa tipologia di campione, l'analisi statistica è influenzata dalla bassa positività globale presente in questa tipologia di campione. Come per i soggetti maschi nessuno dei due patogeni è stato rilevato nei campioni con cellularità inferiore alle 20.000 cellule/prelievo.

Standardizzazione della carica batterica e correlazione con la cellularità del campione

In Tabella 3 è riportato il numero di colonie batteriche lette al microscopio ottico (20x) dopo semina dei 60 campioni su piastre di AGAR A7 correlato con il valore di Ct degli stessi campioni estratti ed amplificati.

La Figura 2 mostra i valori di Ct per i patogeni *Ureaplasma spp.* correlati con i relativi valori di Ct ottenuti per lo stesso campione analizzato mediante il kit Cell Control r-gene. Benché si possa notare una certa tendenza di diminuzione del Ct per *U. parvum* al diminuire del Ct relativo alla cellularità, il coefficiente di correlazione lineare non è significativo ($R^2=0.0467$).

Confronto delle cellularità ottenute prima e dopo l'inserimento del controllo di cellularità nel referto

Nella Tabella 4 e nella Figura 3 sono riportate le cellularità medie ottenute per le diverse matrici dopo l'inserimento del CC nel referto; i tamponi cervicali ($P<0.0005$) e i tamponi uretrali ($P<0.01$) hanno una cellularità significativamente più alta dopo l'inserimento nel referto. Non c'è differenza significativa nella misura delle cellule presenti nei campioni di urine.

Discussione

Con il suo avvento nel campo sia della diagnostica microbiologica che di quella oncologica, la biologia molecolare riveste un ruolo sempre più importante nel laboratorio clinico e non può prescindere da un'attenta analisi e controllo della fase pre-analitica, fonte importante di variabilità e di errore. Non sono molti in letteratura i lavori che studiano come la fase pre-analitica influenzi il dato analitico fornito. *Keegan e collaboratori* (19) dimostrano come l'utilizzo di diversi metodi estrattivi comporti una diversa capacità del test molecolare di rilevare il DNA di *C. trachomatis*, mentre *Peavor e collaboratori* (26) raccomandano un approccio standardizzato all'HPV DNA test con una ottimizzazione della concentrazione iniziale di DNA, piuttosto che di volume di campione, per fornire un numero di inadeguati inferiore all'1% (percentuale adeguata per un efficace programma di *screening*).

Dai risultati del nostro studio emerge come il pre-trattamento del campione incida su due fattori fondamentali: i) la presenza di inibito-

Tabella 3. Numero di colonie di *U. parvum* rilevate al microscopio ottico in relazione al Ct ottenuto con il kit *U. Parvum/Urealyticum Real Time* (Nuclear Laser Medicine), e relativo commento riportato nella refertazione.

Ct	Numero di colonie per campo ottico	Refertazione
≥ 30	0-5	Bassa carica
$23 \geq Ct < 30$	5-15	Carica intermedia
< 23	> 15	Alta carica

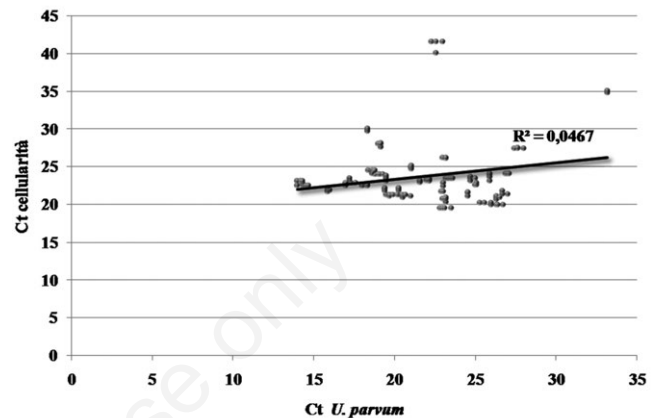
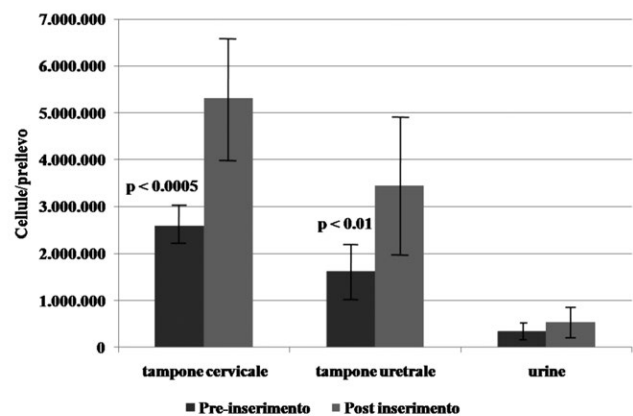


Figura 2. Correlazione tra cellularità del campione e carica batterica: Ct relativo a *U. parvum* rilevato nei tamponi cervicali E-swab e corrispondente Ct relativo alla cellularità misurato nello stesso campione.



* I valori di p vengono riportati solo se significativi

Figura 3. Confronto tra le cellularità medie/prelievo misurate prima e dopo l'inserimento in referto del controllo di cellularità. I valori di P sono riportati solo se significativi.

Tabella 4. Cellularità medie/prelievo misurate (mL per urine) dopo l'inserimento del controllo di cellularità nel referto.

Campione	Totale	C_m	DS	ES	IC 95%
Tampone cervicale	256	5.311.110	10.450.396	653.150	5.311.110 \pm 1.306.299
Tampone uretrale	27	3.441.272	3.869.132	744.615	3.441.272 \pm 1.489.230
Urine	44	542.447	1.093.861	164.906	542.447 \pm 329.811

C_m , cellularità media; DS, deviazione standard; ES, errore standard; IC, intervallo di confidenza.

ri della reazione di amplificazione e ii) la quantità di DNA presente nell'estratto. In sostanza, questa fase influenza sia la qualità che la quantità del materiale genico che deve essere successivamente amplificato.

Il protocollo che si è dimostrato associato ad un minor numero di campioni inibiti è stato il protocollo C_{ThinPrep} (senza pellettamento, con l'utilizzo di buffer ATL e con digestione direttamente in macchina), a cui è associata la massima cellularità/prelievo, ma anche la minima cellularità/PCR, a causa del ridotto volume del campione di partenza. Il valore di cellularità/PCR è un parametro fondamentale per il confronto della sensibilità fra le diverse NAATs, come dimostrato dalla diminuita sensibilità del test molecolare eseguito sull'estratto ottenuto con il protocollo C_{ThinPrep} rispetto a quello ottenuto con protocollo B_{ThinPrep} (25 campioni HPV positivi vs 30). A conferma di ciò si osserva anche che il pre-trattamento in grado di fornire una maggiore positività (e quindi un numero inferiore di falsi negativi) ad HPV 16 a bassa carica è quello a cui è associata la maggiore cellularità/PCR (protocollo B_{ThinPrep}), con la riduzione del parametro cellularità/prelievo che non inficia la qualità analitica. Questo implica che un metodo estrattivo "ideale" dovrebbe permettere una buona inattivazione degli inibitori senza dover sfruttare "l'effetto diluizione" dovuto ad una quantità bassa di materiale di partenza.

L'introduzione dell'IC permette di valutare l'efficacia del pretrattamento del campione nel rimuovere inibitori e la correttezza del processo estrattivo globale; l'IC, però, non permette di valutare la sensibilità analitica del test molecolare, influenzata maggiormente dalla quantità di DNA presente nell'estratto piuttosto che dalla resa dell'estrazione. Questo aspetto, come sopra riportato, è misurabile attraverso il CC e il calcolo della cellularità/PCR, che, comunque, non può prescindere dall'uso di un IC che permetta di valutare la quantità di inibitori presenti nella reazione e che attesti che la misura della quantità di cellule non sia inficiata da inibitori. In definitiva, entrambi i controlli sono necessari e legati a doppio filo, ed il pre-trattamento "ideale" è quello che permette il migliore bilanciamento dei due aspetti: massima resa/minore inibizione.

Altro punto cruciale della fase pre-analitica è la modalità di prelievo che può influenzare sia la resa estrattiva che la sensibilità analitica. Il parametro fondamentale per normalizzare i diversi campionamenti è la cellularità/prelievo piuttosto che la cellularità/PCR. Infatti la cellularità/prelievo è un valore assoluto che tiene conto di tutti i fattori di concentrazione e diluizione e come tale permette di comparare sistemi di prelievo ed estrazione diversi fra loro; la cellularità/PCR, invece, permette di standardizzare quei sistemi dove il *range* di cellularità è importante (inibizione da eccesso di DNA estratto; bassa sensibilità per ridotta rappresentatività del campione).

Nell'era della biologia molecolare, che permette l'amplificazione di regioni *target* a partire da piccole quantità di DNA di partenza, è ancora aperto il dibattito se saggi così sensibili possano permettere l'utilizzo di matrici "non tradizionali", ma meno invasive, come le urine. Questa discussione è particolarmente accesa nell'ambito dei programmi di *screening*, principalmente verso HPV e *C. trachomatis*, nei quali la non invasività del prelievo incrementa la *compliance* del paziente (28, 41). Dai nostri dati emerge che la cellularità/mL della matrice urine è circa 10 volte più bassa della cellularità/prelievo della matrice cervicale ma, inserendo un *cut-off* adeguato (40.000 cellule/mL), la positività per *U. parvum* riscontrata nelle urine non differisce in maniera significativa dalla positività riscontrata nel tampone cervicale (37.5% vs 35%). Al contrario, i campioni di urine al di sotto di questa cellularità presentano una positività significativamente più bassa (inferiore all'8%, $P < 0.05$). Questo implica che la *performance* del saggio in RT-PCR utilizzato per rilevare *U. parvum* è strettamente correlata alla concentrazione di cellule presenti nel campione; nello specifico campioni contenenti meno di 40.000 cellule/mL non sono idonei all'analisi. Tali dati sono supportati da diversi lavori in letteratura (9, 21, 30) nei quali è dimostrato che la minore sensibilità dei saggi molecolari applicati alla matrice urine per la ricerca delle principali MST non

è da attribuirsi, come ipotizzato da altri autori (7), alla particolare presenza di inibitori in questa matrice specifica, ma sembra piuttosto legata alla bassa cellularità della matrice stessa. *Manoni e collaboratori* in un recente studio (23) hanno dimostrato che il numero delle cellule totali presenti nelle urine sono significativamente più alte nelle urine primo getto, campione di elezione per la rilevazione di *C. trachomatis* e di altre MST negli uomini (21), rispetto a quelle presenti nelle urine di getto intermedio. La maggiore positività a *U. parvum* nei campioni di urina con cellularità più alta riscontrata nel nostro studio può essere quindi dovuta al fatto che questi campioni siano più frequentemente urine primo getto, mentre quelle a cellularità più bassa urine di mitto intermedio. Da qui l'importanza del parametro cellularità/mL di urine quale strumento per riconoscere le urine primo getto (campioni più idonei per la rilevazione dei patogeni uro-genitali).

Quanto riportato supporta l'idea di molti autori di estendere alle donne l'utilizzo della matrice urine primo getto per lo *screening* delle principali MST (28, 41); il suo utilizzo comunque non può prescindere da un CC a monte che verifichi l'idoneità del prelievo e che abbassi il rischio di falsi negativi. Tuttavia, i dati riguardanti la correlazione fra la cellularità della matrice urine e la frequenza di positività a *C. trachomatis* non contribuiscono ad avvalorare il suo utilizzo per lo *screening* di patogeni cervicali, a causa del basso numero di campioni positivi considerati. Infatti, la differenza di positività sopra e sotto *cut-off* non raggiunge la significatività statistica neppure nella matrice cervicale, campione *gold standard* per la ricerca di *C. trachomatis*, sempre a causa della bassa prevalenza dell'infezione. L'incremento dei campioni analizzati probabilmente sarebbe in grado di rendere statisticamente significativa la diminuzione della frequenza di positività osservata nei prelievi con cellularità sopra e sotto il *cut-off* di cellularità (5.4% vs 1.3%).

Diversi sono gli studi che hanno misurato una correlazione tra cellularità e positività a *C. trachomatis* con test molecolari (6, 20, 22, 42). Nello specifico questi studi, basati sulla conta delle cellule effettuata su vetrino al microscopio ottico, dimostrano come il numero di cellule endocervicali (le cellule bersaglio di *C. trachomatis*) correla con la positività per questo patogeno. Se tale correlazione può avere una diretta e plausibile causa biologica, quella osservabile nel nostro studio, tra il numero totale di cellule e la positività al patogeno, può essere spiegata indirettamente con l'idoneità del prelievo. In particolare, l'adeguato numero di cellule totali nel campione è indice di un prelievo adeguato e quindi dell'idoneità del campione per l'esecuzione del saggio molecolare.

Questo aspetto è particolarmente chiaro nel caso della positività a *U. parvum* nei tamponi cervicali. *U. parvum* non è un patogeno intracellulare, ma un patogeno opportunistico di superficie che colonizza l'epitelio cervico-vaginale. Non esistono studi in letteratura che valutano l'idoneità del campione mediante la definizione di *cut-off* di cellularità e la differenza statistica di positività ad *U. parvum* sopra/sotto *cut-off*. I dati del nostro studio indicano chiaramente che, al di sotto di una cellularità soglia (a partire da un *cut-off* di 300.000 cellule/prelievo), la capacità del saggio in RT-PCR per la ricerca di *U. parvum* risulta drasticamente compromessa. A dispetto di una frequenza globale del 35%, comparabile con quella misurata negli altri studi presenti in letteratura (36, 40), soltanto l'11% dei campioni al di sotto del *cut-off* di 200.000 cellule/prelievo risulta positivo ($P < 0.005$). Questa correlazione è chiaramente legata all'adeguatezza del prelievo, non essendo *U. parvum* un batterio intracellulare.

L'importanza dell'inserimento di un CC come indice di qualità del dato analitico fornito è ulteriormente confermata dal confronto delle cellularità medie ottenute prima e dopo il suo inserimento in sede di refertazione. La Figura 3 mostra chiaramente come tutte le matrici analizzate presentino una cellularità più alta dopo l'inserimento del parametro cellule/prelievo nel referto. Questo si osserva specialmente per quelle matrici che risentono maggiormente dell'operatore, come la matrice cervicale, che presenta un'elevata significatività statistica ($P < 0.0005$) nella differenza fra pre e post inserimento. Inoltre l'inseri-

mento di questo controllo nel referto ha permesso una riduzione del 15% dei prelievi non idonei, grazie soprattutto alla maggiore attenzione posta dagli operatori nell'effettuazione del prelievo in presenza di una misura efficace del loro operato. Come riportato da *Bianchi e collaboratori* (8), la riduzione dei prelievi non idonei permette un risparmio in termini di sovra-trattamento, ripetizioni di analisi e sovra-indagini aumentando l'efficacia e l'efficienza analitica in questo settore in espansione della diagnostica molecolare.

Nei tamponi cervicali l'analisi della correlazione tra positività al patogeno e idoneità del prelievo si è dimostrata particolarmente significativa nel caso dell'HPV. L'idoneità del campione cervicale citologico è una questione studiata a fondo in anatomia patologica. Il Bethesda System 2001 stabilisce che un prelievo idoneo deve avere un numero minimo di cellule squamose ectocervicali (8000-12.000 cellule/vetrino per la citologia tradizionale, 5000 per la citologia su base liquida) e almeno 10 cellule endocervicali/metaplastiche. I saggi molecolari per l'HPV, nell'ambito degli *screening*, sono stati introdotti prima per la gestione delle donne con citologia ASC-US (2) (con alterazioni citologiche di incerto significato) e per il follow-up delle donne trattate (3) e successivamente nello *screening* primario. Numerosi sono gli studi pilota che hanno dimostrato come questo saggio molecolare aumenti in maniera significativa l'efficacia dello *screening* (31), incrementandone la sensibilità e quindi la capacità di individuare donne con lesioni pre-cancerose.

Dal 2012 sia le linee guida italiane (31) sia quelle americane (34) hanno introdotto l'utilizzo dell'HPV test come saggio di *screening* primario per le donne con età superiore ai 35 anni, ma con una sostanziale differenza: se da un lato le linee guida americane raccomandano un co-test (cioè l'utilizzo del test HPV in contemporanea con il pap-test) e sconsigliano l'utilizzo del solo HPV test a causa dell'inesistenza, ad oggi, di metodi standardizzati per la verifica dell'idoneità del prelievo (in caso di co-test valutata sul vetrino citologico), le linee guida italiane sostengono che non esistono prove della maggiore protezione del co-test rispetto al solo HPV test, e quindi ne raccomandano l'utilizzo da solo (31).

I dati ottenuti dal nostro studio avvalorano le raccomandazioni delle linee guida americane: nei tamponi cervicali, infatti, è stata misurata una significativa differenza di positività al virus HPV nei campioni sopra e sotto un *cut-off* di 300.000 cellule/prelievo (59.6% vs 40.3%, $P < 0.005$). Questa differenza, anche se non statisticamente significativa, è stata osservata anche per *C. trachomatis*, suggerendo l'ipotesi che la causa sia sostanzialmente indipendente dal patogeno, ma piuttosto intrinseca alle caratteristiche del prelievo. Da questa osservazione consegue che non è sufficiente né una valutazione qualitativa della cellularità né una valutazione semi-quantitativa basata sulla sola analisi del Ct, ma bensì è necessaria una valutazione quantitativa assoluta con impiego di standard a titolo noto, al fine di considerare anche la variabilità inter-saggio che caratterizza i saggi in RT-PCR.

Nonostante le raccomandazioni delle linee guida americane, l'idoneità del prelievo cervicale nell'era dell'HPV test sembra passata in secondo piano. Molti sono i lavori in letteratura che valutano la carica virale, l'integrazione del DNA virale nel genoma ospite, la sensibilità analitica e clinica dei saggi molecolari per la ricerca dell'HPV, ma praticamente inesistenti sono i lavori che valutano in maniera sistematica la cellularità del campione, definendo criteri di idoneità misurabili con ripetibilità. Nemmeno le linee guida dei requisiti di un saggio HPV DNA per lo *screening* primario del cervicocarcinoma (24) menzionano l'idoneità del prelievo; lo stesso Hybrid Capture II (Qiagen), il test HPV più utilizzato in ambito di *screening* primario, non presenta nessun tipo di controllo di idoneità (31). Soltanto alcuni test di RT-PCR presentano un CC che individua come idonei quei campioni con un Ct relativo all'amplificazione del gene umano beta-globina inferiore a 35 (14), ma non esistono studi che correlino questo valore di Ct ad un valore di cellularità del campione, né evidenze scientifiche che il *cut-off* scelto sia effettivamente il migliore, cioè quello in grado di scongiurare al meglio il rischio di risultati falsi negativi.

I nostri risultati rafforzano l'idea che uno *screening* primario basato sull'utilizzo del solo HPV test non possa prescindere dall'utilizzo di un controllo di idoneità del campione, con *cut-off* di cellularità standardizzati basati su consolidate evidenze scientifiche. È quindi da ritenersi indispensabile la valutazione dell'adeguatezza del prelievo che può essere anche valutata separatamente, mediante citologia tradizionale o con l'utilizzo di saggi molecolari che amplificano geni umani. Questi ultimi tuttavia hanno il limite di non poter differenziare la tipologia di cellula (endocervicale piuttosto che ectocervicale), parametro su cui è stata basata la valutazione del prelievo per la ricerca di *C. trachomatis* (6, 20). I dati del nostro studio tuttavia indicano che la misura della cellularità permette comunque una valutazione indiretta dell'idoneità del prelievo, e candidano quindi la quantificazione assoluta della cellularità del campione come un eccellente metodo (automatizzabile e standardizzabile) per la valutazione dell'idoneità del campione nell'ambito della diagnostica molecolare.

Bibliografia

1. Aboul-Fotouh MEM, Hana IT. Clinical validation of high risk HPV DNA testing versus ThinPrep cytology for primary cervical cancer screening. *Mid East Fertility Soc J* 2013; 18: 102-9.
2. Apgar BS, Zoschnick L. The 2001 Bethesda system terminology. *Am Fam Physician* 2003; 68: 1992-8.
3. Arbyn M, Anttila A, Jordan J, et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Second edition-summary document. *Ann Oncol* 2010; 21: 448-58.
4. Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI). Le cerviciti. Percorso diagnostico presentato durante il XXXIX Congresso nazionale AMCLI - Rimini, 20-22 ottobre 2010.
5. Barbieri D, Nocera M, Gallinella G, et al. Comparison of HPV sign genotyping test with INNO-LiPA HPV Genotyping Extra assay on histologic and cytologic cervical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 74: 43-8.
6. Beebe JL, Gershman KA, Kelley JK, et al. How adequate is adequate for the collection of endocervical specimens for Chlamydia trachomatis testing? *Sex Transm Dis* 1999; 26: 579-83.
7. Betsou F, Beaumont K, Sueur JM, Orfila J. Construction and evaluation of internal control DNA for PCR amplification of Chlamydia trachomatis DNA from urine samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1274-6.
8. Bianchi L, Nicolai M, Napoli Z, et al. Evoluzione tecnologica, nuovi bisogni diagnostici e spending review: meningiti e patologia ginecologica infettiva. XLI Congresso Nazionale Associazione Microbiologi Clinici Italiani, 13-16 Novembre 2012, Rimini, poster n. 163.
9. Bignell C. 2009 European (IUSTI/WHO) guideline on the diagnosis and treatment of Gonorrhoea in adults. *Int J Std AIDS* 2009; 20: 453-7.
10. Bigras G, de Marval F. The probability for a Pap test to be abnormal is directly proportional to HPV viral load: results from a Swiss study comparing HPV testing and liquid-based cytology to detect cervical cancer precursors in 13 842 women. *Br J Cancer* 2005; 93: 575-81.
11. Bodily J, Laimins LA. Persistence of human papilloma virus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol* 2011; 19: 33-9.
12. Boulet GAV, Benoy IH, Depuydt CE, et al. Human papillomavirus 16 load and E2/E6 ratio in HPV16-positive women: biomarkers for cervical intraepithelial neoplasia ≥ 2 in a liquid-based cytology setting? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 2992-9.
13. Camporese A. Razionale e linee guida della medicina molecolare in microbiologia clinica. S.o. di microbiologia clinica e terapia antibiotica. *Riv Med Lab - JLM* 2003; 4: 67-73.
14. Carozzi FM, Burrioni E, Bisanzi S, et al. Comparison of clinical

- performance of Abbott Real Time High Risk HPV test with that of Hybrid Capture 2 assay in a screening setting. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1446-51.
15. De Sanjose S, Quint WG, Alemany L, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 2010; 11: 1048-56
 16. Flores YN, Bishai DM, Shah KV, et al. Risk factors for cervical cancer among HPV positive women in Mexico. *Salud Publica Mex* 2008; 50: 49-58.
 17. Grundhoefer D, Patterson BK. Determination of liquid-based cervical cytology specimen adequacy using cellular light scatter and flow cytometry. *Comm Clin Cytometry* 2001; 46: 340-4.
 18. Joste NE, Kundsinn RB, Genest DR. Histology and ureaplasma urealyticum culture in 63 cases of first trimester abortion. *Am J Clin Pathol* 1994; 102: 729-32.
 19. Keegan H, Boland C, Malkin A, et al. Comparison of DNA extraction from cervical cells collected in PreservCyt solution for the amplification of *Chlamydia trachomatis*. *Cytopathology* 2005; 16: 82-7.
 20. Kellogg JA, Seiple JW, Klinedinst JL, et al. Improved PCR detection of *Chlamydia trachomatis* by using an altered method of specimen transport and high-quality endocervical specimens. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2765.
 21. Lanjouw E, Ossewaarde JM, Stary A, Boag F. 2010 European guideline for the management of *Chlamydia trachomatis* infections. *Int J STD AIDS* 2010; 21: 729-37.
 22. Loeffelholz MJ, Jirsa SJ, Teske RK, Woods JN. Effect of endocervical specimen adequacy on ligase chain reaction detection of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3838-41.
 23. Manoni F, Gessoni G, Alessio MG, et al. Mid-stream vs. first-voided urine collection by using automated analyzers for particle examination in healthy subjects: an Italian multicenter study. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50: 679-84.
 24. Meijer CJLM, Berkhof J, Castle PE, et al. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer* 2009; 124: 516-20.
 25. Muller JK, Pedersen LN, Persson K. Comparison of the Abbott real time CT new formulation assay with two other commercial assay for detection of wild-type and new variant strains of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 440-3.
 26. Peevor R, Jones J, Fiander AN, Hibbitts S. Development of optimal liquid based cytology sample processing methods for HPV testing: minimising the inadequate test result. *J Virol Methods* 2011; 173: 374-7.
 27. Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative Real-Time PCR technique. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 886-91.
 28. Pimenta JM, Catchpole M, Rogers PA, et al. Opportunistic screening for genital chlamydial infection. I: Acceptability of urine testing in primary and secondary healthcare settings. *Sex Transm Infect* 2003; 79: 16-21.
 29. Poljak M, Kocjan BJ. Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8: 1139-62.
 30. Renton A, Thomas BM, Gill S, et al. *Chlamydia trachomatis* in cervical and vaginal swabs and urine specimens from women undergoing termination of pregnancy. *Int J STD AIDS* 2006; 17: 443-7.
 31. Ronco G, Biggeri A, Confortini M, et al. HPV DNA based primary screening for cervical cancer precursors. *Epidemiol Prev* 2012; 36: e1-72.
 32. Rose M, Viscardi MD. Ureaplasma species: role in diseases of prematurity. *Clin Perinatol* 2010; 37: 393-409.
 33. Sachdeva P, Patel AL, Sachdev D, et al. Comparison of an in-house PCR assay, direct fluorescence assay and the Roche AMPLICOR *Chlamydia trachomatis* kit for detection of *C. trachomatis*. *J Med Microbiol* 2009; 96: 867-73.
 34. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *Ca Cancer J Clin* 2012; 62: 147-72.
 35. Saunier M, Monnier-Benoit S, Mauny F, et al. Analysis of human papillomavirus type 16 (hpv16) DNA load and physical state for identification of hpv16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3678-85.
 36. She RC, Simmon KE, Bender JM, et al. Mollicutes infections in neonates. *Pediatr Infect Dis* 2009; 28: 248-50.
 37. Sherman ME, Kahler J, Gustafson KS, Wang SS. Sip volume as a quality indicator in liquid-based cervical cytology. *Cancer* 2006; 108: 462-7.
 38. Siebers A, Klinkhamer PJ, Vedder JE, et al. Causes and relevance of unsatisfactory and satisfactory but limited smears of liquid-based with conventional cervical cytology. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136: 76-83.
 39. Tsai HT, Wu CH, Lai HL, et al. Association between quantitative high-risk human papillomavirus DNA load and cervical intraepithelial neoplasm risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2544-9.
 40. Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 757-89.
 41. Watson EJ, Templeton A, Russell I, et al. The accuracy and efficacy of screening tests for *Chlamydia trachomatis*: a systematic review. *J Med Microbiol* 2002; 51: 1021-31.
 42. Welsh LE, Quinn TC, Gaydos CA. Influence of endocervical specimen adequacy on PCR and direct fluorescent-antibody staining for detection of *Chlamydia trachomatis* infections. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3078-81.
 43. World Health Organization. Global strategy for prevention and control of sexually transmitted infection: 2006-2015; 2007, Geneva, Svizzera.
 44. Zeighami H, Peerayeh SN, Yazdi RS, et al. Prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* in semen of infertile and healthy men. *Int J STD AIDS* 2009; 20: 387-90.