
S1.2

**ANALISI MOLECOLARE DI HPV
GENITALI AD ALTO RISCHIO
IN LESIONI CERVICALI MONITORATE
NELLA REGIONE EMILIA ROMAGNA**
Zerbini M.L.
*Dipartimento di Medicina Clinica Specialistica e
Sperimentale, Università di Bologna*

L'infezione da HPV può causare lesioni epiteliali di diverso grado. Da studi epidemiologici emerge infatti che la persistenza d'infezioni da HPV ad alto rischio oncogeno precede e predice lo sviluppo in senso maligno delle lesioni squamose intraepiteliali. In questi ultimi anni quindi, l'utilizzo di test molecolari per la ricerca di HPV ad alto rischio oncogeno ha trovato ampia diffusione come strumento diagnostico fondamentale per l'implementazione dell'esame citologico nella prevenzione del carcinoma del collo dell'utero e nel follow up di pazienti trattate per lesioni di alto grado.

Nel nostro laboratorio sono stati analizzati, nel periodo 2001-2006, 7113 campioni citologici eso-endocervicali di pazienti in età compresa tra i 16 e gli 80 anni (età media 36.68), l'incremento degli esami effettuati in questo periodo è stato del 232 %. Dei 7113 campioni citologici esaminati, 6932 sono stati analizzati mediante test di ibridazione con amplificazione del segnale (HCII) e 968 analizzati e tipizzati mediante PCR-ELISA.

Considerando che i campioni che pervengono al laboratorio non provengono da donne inserite nel programma di screening regionale, ma provengono da pazienti che presentano già, nella maggior parte dei casi, alterazioni citologiche e/o cliniche, la positività osservata è rispettivamente del 34,43% per il test HCII e del 56,61% per la PCR-ELISA, essendo di norma la PCR-ELISA un test di secondo livello rispetto all'HCII.

I genotipi identificati mediante PCR-ELISA sono gli alti rischi 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58, con una prevalenza rispettivamente del 28,37% 5,31% 11,84% 7,55% 3,06% 1,84% 6,33% 6,53%; sono inoltre tipizzati i bassi rischi 6 ed 11 con prevalenza rispettivamente del 3,47% e del 1,43%, il 24,29% dei campioni rimane non tipizzato. Nel 12,4% dei campioni è stata riscontrata un'infezione mista.

Sono state inoltre analizzate circa 350 pazienti trattate chirurgicamente per lesioni di alto grado, circa 150 di queste pazienti sono state seguite per un follow up di almeno 12 mesi dal trattamento. Nell'ambito di questo follow up sono stati studiati diversi parametri molecolari virali e cellulari che possono essere attualmente considerati marker di malattia quali: carica

virale, stato fisico ed espressione degli mRNA degli oncogenivirali E6/7, è stato inoltre messo a punto un metodo quantitativo per l'analisi della proteina cellulare P16, la cui sovraespressione è correlata all'attivazione della oncoproteina E7 degli HPV ad alto rischio.

Concludendo quindi abbiamo a disposizione tecniche molecolari raffinate che ci permettono di diagnosticare non solo la presenza di HPV ad alto rischio oncogeno nel campione in esame, ma ci possono fornire informazioni sullo stadio e sull'evoluzione della malattia.

S1.3

**LA TIPIZZAZIONE GENOTIPICA NEL
CONTROLLO DELLE INFEZIONI.
STATO DELL'ARTE**
Facinelli B.
*Istituto di Microbiologia e Scienze Biomediche
- Facoltà di Medicina e Chirurgia
- Università Politecnica delle Marche*

Il controllo delle infezioni prevede l'identificazione dei microrganismi responsabili, l'individuazione dei possibili serbatoi e delle vie di trasmissione, e l'interruzione della trasmissione. Negli ultimi anni, l'aumento delle infezioni nosocomiali, spesso associato al fenomeno della farmaco-resistenza, ha reso imperativo questo controllo. Le infezioni nosocomiali sono molto spesso il risultato dell'esposizione ad un serbatoio comune di infezione. I microrganismi più frequentemente coinvolti appartengono a specie molto comuni e spesso sono geneticamente correlati. In questi casi, l'identificazione a livello di specie non consente di seguire la circolazione del ceppo epidemico, in quanto è difficile distinguere tra colonizzazione ed infezione. E' quindi necessario tipizzare, cioè mettere in evidenza marcatori specifici presenti nel ceppo epidemico ed assenti nei ceppi della stessa specie non correlati. Il Laboratorio di Microbiologia partecipa attivamente al controllo delle infezioni, in quanto possiede gli strumenti necessari per identificare e tipizzare i microrganismi responsabili. Prima dello sviluppo delle tecniche basate sul DNA, la tipizzazione microbiologica si avvaleva di tecniche in grado di mettere in evidenza differenze nel fenotipo (biochimiche, sierologiche, di sensibilità o di resistenza ad antibiotici, sali di metalli pesanti, fagi, batteriocine, etc.). La biotipizzazione, ancora oggi un metodo relativamente valido, presenta lo svantaggio di essere per lo più microrganismo-specifica. La tipizzazione genotipica, invece, avvalendosi di tecniche mutuata dalla biologia molecolare ed analizzando

il genoma, è universale, cioè applicabile a tutti i microrganismi. La tipizzazione genotipica è uno strumento epidemiologico perchè permette di stabilire la relazione (distanza) genetica tra gli isolati, cioè permette di seguire la circolazione dei microrganismi e di individuarne il serbatoio. Mediante tipizzazione genotipica è possibile analizzare il genoma batterico sia nella parte più conservata (*core gene pool*: geni che assolvono funzioni chiave per la vita della cellula) che nella parte variabile (*flexible gene pool*: geni localizzati su plasmidi, transposoni, fagi, isole genomiche), responsabile dell'evoluzione accelerata. La scelta di un metodo piuttosto di un altro molto spesso dipende dal tipo di quesito epidemiologico a cui si deve rispondere (epidemie localizzate nel tempo e nello spazio oppure epidemie a lungo termine o su vasta scala) e dal tipo di microrganismo da tipizzare. È importante sottolineare che nessun metodo di tipizzazione presenta tutti i requisiti richiesti (standardizzabile, sensibile, di semplice esecuzione e facile interpretazione, economico, etc.). L'applicazione combinata di più metodi è spesso necessaria per delineare un profilo specifico degli isolati. La relazione ha come obiettivo quello di inquadrare lo stato attuale della tipizzazione genotipica.

S1.4

TRASMISSIONE ORIZZONTALE E DIFFUSIONE INTERSPECIFICA DELLE RESISTENZE AGLI ANTIBIOTICI IN BATTERI GRAM-NEGATIVI

Carattoli A.

Istituto Superiore di Sanità - Roma

Il trasferimento orizzontale mediante plasmidi rappresenta il più frequente meccanismo di diffusione delle resistenze agli antibiotici nei batteri Gram-negativi. Il fenomeno della resistenza multipla è anch'esso legato alla disseminazione di elementi genetici localizzati sui plasmidi (integroni, transposoni) in grado di mobilitare simultaneamente diversi geni di resistenza, promuovendone il trasferimento tra batteri di specie diversa. Questi elementi genetici si sono evoluti e continuano ad evolversi mediante l'acquisizione di nuovi geni di resistenza e di nuove combinazioni di geni.

Studi internazionali recenti hanno evidenziato elementi genetici di resistenza comuni e frequenti nelle popolazioni di *Enterobacteriaceae* di origine nosocomiale e comunitaria circolanti in Europa. In particolare sono stati ampio oggetto di studio gli elementi responsabili della diffusione delle beta-lattamasi di maggior rilevanza clinica quali le CTX-M e altre beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) e le resistenze

ai fluorochinoloni mediate da plasmidi. Il fenomeno della trasmissione di questi elementi è legato a disseminazione inter e intra-ospedaliera ma in alcuni casi è possibile rilevare una diffusione animale-uomo. La diffusione di plasmidi emergenti, a largo spettro d'ospite, responsabili della disseminazione di geni di resistenza rilevanti da un punto di vista clinico e la loro epidemiologia in Europa saranno presentati come argomenti di aggiornamento e discussione delle eventuali strategie di contenimento del fenomeno.

S1.6

GRUPPI FILOGENETICI E DETERMINANTI DI VIRULENZA IN *E. COLI*

Fortina G., Caroppo, S.

Premesse. *Escherichia coli* (*E. coli*) è nell'uomo la più frequente causa di infezioni extra-intestinali da batteri gram-negativi. Studi recenti suddividono la specie in quattro principali gruppi filogenetici, A, B1, B2 e D.

È inoltre noto che numerosi fattori di virulenza conferiscono ad *E. coli* la capacità di causare infezioni sistemiche.

Metodi. Novantaquattro ceppi di *E. coli*, isolati dal distretto ematico (25), urinario (32), respiratorio (12) ed intestinale (25), sono stati classificati nei quattro principali gruppi filogenetici mediante una multiplex PCR su tre sequenze di DNA caratteristiche dei diversi genotipi.

Sui ceppi in esame sono stati ricercati mediante PCR i marker per 29 fattori di virulenza, rappresentati da fimbrie, siderofori, antigeni capsulari, tossine, fattori di resistenza sierica ed isole di patogenicità.

Oltre a ciò, i ceppi raccolti sono stati sottoposti a rep-PCR e ad una successiva analisi di clustering, per evidenziare eventuali similarità a livello di profilo molecolare, anche in rapporto al corredo di virulenza.

Risultati. Si è rilevata una prevalenza dei genotipi B2 e D nelle emocolture (in entrambi i casi il 32% dei ceppi), a fronte di una maggior frequenza del genotipo A nelle feci (52%) e nei campioni respiratori (66%). Nelle urine i genotipi più rappresentati sono risultati B2 (56%) ed A (31%). È stato possibile evidenziare un maggior numero di elementi di patogenicità nei gruppi B2 e D rispetto ad A e B1 (8 vs 3; $p < 0.001$). Alcuni di essi (fimbrie S, F1C, P, fattore necrotizzante di tipo 1, α -emolisina, isole di patogenicità, capsula e fattore d'invasione dell'endotelio cerebrale) sono risultati più frequentemente presenti nei filogruppi B2 e D rispetto ad A e B1.

L'analisi di clustering ha raccolto 78 dei 90 campioni saggiati in due cluster, il primo costituito nel 96,77% dei casi dai gruppi filogenetici B2 e D, il secondo nel