

zione scende al 50% per Ratio comprese tra 3-6 E AL 10% PER Ratio tra 1-3.

Conclusioni: perchè continuare ad eseguire i test RIBA quando dallo screening si ottengono valori di Ratio superiori a 6?

P184

GENOTIPIZZAZIONE DI HPV A "LOCALIZZAZIONE GENITALE" CON METODO IMMUNOENZIMATICO (ELISA) E METODO DELLA IBRIDAZIONE INVERSA.

Giannattasio A., *Ricco C.S., Cuniato V., Falco E., Alterio A., Scancarriello G., Galano G., Smeraglia R.

*Virologia P.O. "C. Ascalesi": Direttore Prof. Riccardo Smeraglia - A.S.L. Napoli I, * U.O.C. Ostetricia e Ginecologia P.O. SS. Annunziata Napoli - A.S.L. Napoli I*

I papilloma virus umani (HPV) rappresentano una delle cause più comuni di malattie sessualmente trasmesse. In rapporto all'associazione con lesioni precancerose e cancerose della cervice uterina, gli HPV vengono raggruppati in base al rischio oncogenico (basso, medio, alto).

Lo scopo del nostro studio è quello di porre a confronto due metodiche che consentono la genotipizzazione dell'HPV a localizzazione uterina: 1) screening, mediante metodo ELISA, della regione genomica L1 (Amplimedical SpA) 2) INNO-LiPA HPV Genotyping (Innogenetics SRL).

Lo studio in oggetto è stato effettuato su 10 pazienti, tra 18 e 50 anni, sessualmente attive e affette da patologia cervicale indotta da HPV. Ogni paziente è stata sottoposta al prelievo per lo screening e la tipizzazione virale e al Pap Test. Il genoma virale è stato estratto ed amplificato mediante PCR utilizzando una metodica dell'Amplimedical SpA. Le PCR che hanno dato esito positivo sono state sottoposte a genotipizzazione virale, utilizzando sia il Geno-Kit HPV L1 generale-ELISA (Amplimedical) sia l'INNO-LiPA HPV Genotyping (Innogenetics), basato sul principio della ibridazione inversa di parte della regione L1 del genoma dell'HPV.

Delle 10 pazienti sottoposte allo screening, 7 sono risultate positive all'HPV. I 7 campioni positivi, sottoposti a genotipizzazione virale con entrambe le metodiche, hanno dato i seguenti risultati: i campioni 1, 3, 4 e 7 erano positivi per il genotipo 16 con entrambe le metodiche; i campioni 2 e 6 risultavano non genotipizzabili con metodica Amplimedical e positivi per il genotipo 16 con metodica Innogenetics; infine il campione 5 risultava non genotipizzabile con metodica Amplimedical e positivo per i genotipi 11 e 52 con metodica Innogenetics.

I risultati ottenuti mostrano discordanze tra le due tecniche usate per la genotipizzazione dell'HPV. Ciò, verosimilmente, potrebbe essere dovuto all'esiguità dei campioni presi in esame. Pertanto sarà necessario confermare i dati ottenuti su un numero più congruo di campioni.

P185

RICERCA DI GENOTIPI DI PAPPILLOMAVIRUS GENITALI: CONFRONTO FRA DUE METODI MOLECOLARI

Grossini E., Nicosia A.M., Ravanini P., Fortina G.

Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Ospedale Maggiore Novara

In questo studio, sono stati messi a confronto due test del

commercio per la genotipizzazione degli HPV genitali: il test "INNO-LiPA HPV Genotyping" (Innogenetics) e i test "Geno-Kit HPV L1 Generale" e "Geno-Kit HPV L1 Alto Rischio" (Amplimedical).

L'abbinamento dei due test Geno-Kit HPV L1 di Amplimedical permette la tipizzazione di 10 differenti tipi virali, ritenuti dalla letteratura i più diffusi nella popolazione: 2 tipi a "basso rischio" (6 e 11), 4 tipi a "rischio intermedio" (33, 35, 52 e 58) e 4 tipi ad "alto rischio" (16, 18, 31 e 45). Il test INNO-LiPA permette invece la tipizzazione di 26 differenti tipi di interesse genitale: 4 ad "alto rischio" (16, 18, 31 e 45), 9 a "rischio intermedio" (33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 68) e 13 a "basso rischio" (6, 11, 34, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 66, 70, 73 e 74).

In un primo gruppo sono stati analizzati in doppio, con entrambi i test considerati, 39 campioni di cytobrush cervicale risultati positivi per la ricerca di HPV-DNA (con test di amplificazione HPV Screening COMBI KIT Special - Amplimedical). In un secondo gruppo di campioni sono stati considerati i risultati provenienti da 106 campioni analizzati con i test Geno-Kit HPV L1 e da altri 124 campioni analizzati con il test INNO-LiPA.

Analizzando i risultati ottenuti nel primo gruppo di 39 campioni, si nota come la concordanza dei risultati è completa solo in 7 campioni su 39 (17,9%), mentre i due test risultano discordanti in 32 casi su 39 (82,1%). Questa discordanza appare parziale (almeno un tipo virale comune nel caso di coinfezioni riscontrate da uno o entrambi i test) nel 28,2% dei casi (11/39); mentre la discordanza è totale in ben il 53,8% dei casi (21/39).

In entrambi i gruppi, le differenze più importanti riguardano i genotipi a "basso rischio" (ben il 28,2% dei casi per il test INNO-LiPA e solo il 4,7% per i test Geno-Kit HPV L1); e per i genotipi a "rischio intermedio" (il 35,5% per il test INNO-LiPA contro il 10,4% per i test Geno-Kit HPV L1). Sovrapponibili appaiono invece le positività nel caso dei tipi ad "alto rischio" (35,5% dei casi per il test INNO-LiPA e 37,7% per i test Geno-Kit HPV L1).

P186

REATTIVITA' ANTI-HCV A BASSO LIVELLO CON TRE TEST DI SCREENING E UN TEST SUPPLEMENTARE: RILEVANZA E POSSIBILI CAUSE

A. Gussago¹, A. Rodella¹, S. Metelli¹, C. Galli²

¹*III Laboratorio analisi, Spedali Civili, Brescia;*

²*Abbott Divisione Diagnostici, Roma*

Una reattività anti-HCV a basso livello con i test di screening è un evento frequente e spesso non chiarito dai test di secondo livello, che indicano nella maggior parte dei casi una situazione di reattività rivolta verso antigeni di una sola regione di HCV. In questo studio abbiamo considerato da un punto di vista demografico e analitico i risultati "dubbi" per anti-HCV osservati nell'arco di 5 mesi.

Pazienti e metodi: sono stati considerati 150 campioni ottenuti da altrettanti pazienti (70 femmine; mediana età 60,5 anni e 80 maschi; mediana età 56 anni) tra settembre 2003 e febbraio 2004, di cui: a) 53 negativi "alti" (S/CO tra 0,50 e 0,99) al test di screening (AxSYM HCV 3.0); b) 94 con reattività a basso livello al test di screening (S/CO tra 1 e 10); 3 con reattività medio-alta al test di screening (S/CO >10) di cui 2 negativi al test supplementare. Tutti i campioni sono stati caratterizzati con il test supplementare Chiron RIBA-3 analizzati anche con altri due test per screening anti-HCV,

entrambi in chemiluminescenza, rispettivamente su Vitros (Ortho) e su Architect (Abbott).

Risultati: Dei campioni analizzati, 9 sono risultati positivi, 89 indeterminati e 52 negativi al RIBA-3. I due test Vitros e Architect erano apparentemente più specifici di AxSYM, a causa del "bias" di selezione iniziale, ma hanno mostrato diverse affinità; il test Vitros per anti-core (reattività sugli indeterminati: 55/55; 100%) e il test Architect per anti-NS3 (reattività sugli indeterminati: 16/17; 94,2%). I falsi positivi erano significativamente meno frequenti nei soggetti >65 anni (18% contro 44%; $p = 0,038$). Questi pazienti mostravano anche una maggiore frequenza di reattività anti-core e una minore frequenza di reattività anti-NS3, anti-NS4 e anti-NS5; le ultime due sono da ritenersi aspecifiche.

Conclusioni. Le reattività a basso livello per anti-HCV devono essere valutate tenendo conto dell'età dei pazienti. Nei giovani sono spesso false positività, probabilmente dovute a sostanze interferenti; negli anziani è molto probabile invece che si tratti di "code" di positività in seguito ad un'infezione in via di risoluzione, quadro che è apparso assai frequente (19% in 10 anni) in uno studio recente.¹

BIBLIOGRAFIA

1. Mazzeo C. et al, GUT 2003; 52: 1030-1034.

P187

STUDIO DELLE SOMIGLIANZE GENETICHE TRA ENTEROVIRUS UMANI E SUINI.

La Rosa¹ G.; Muscillo¹ M.; Sali¹ M.; De Carolis¹ E.; Cordioli² P.; M. Tollis².

¹Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Ambiente e Prevenzione Primaria, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma.

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e dell'Emilia, Via A. Bianchi, 7 25125 Brescia.

³Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Sanità Alimentare ed Animale, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma.

Gli enterovirus suini, membri della famiglia *Picornaviridae*, sono responsabili di patologie di varia entità: infezioni asintomatiche, disordini neurologici, disordini di fertilità, gastroenteriti, pericarditi e miocarditi, lesioni del derma.

Originariamente classificati come enterovirus sulla base delle caratteristiche biologiche e fisico-chimiche, sono stati recentemente riclassificati, sulla base di studi molecolari, in tre gruppi: enterovirus suini A (sierotipo 8), enterovirus suini B (sierotipi 9 e 10) e un nuovo genere chiamato *Teschovirus* che include una singola specie con almeno 11 distinti sierotipi.

Alcuni sierotipi sono, in particolari regioni, geneticamente simili ad enterovirus umani soprattutto ai coxsackievirus pertanto possono creare problemi di interferenza nella diagnostica degli enterovirus umani, soprattutto in campo ambientale.

In questo lavoro, per verificare le somiglianze genetiche tra enterovirus umani e suini, sono state testate diverse coppie di primer di PCR su ceppi di virus isolati su linee cellulari primarie di rene suino e su ceppi di riferimento dell'ATCC (American Type Culture Collection).

Sono stati inoltre utilizzati come controlli RNA di SVDV (Swine Vesicular Disease Virus) e Coxsackievirus A9 (strain Griggs, ATCC).

In particolare, sono stati testati set di primer specifici per enterovirus suini per la regione del 5' non codificante, la regione conservata della RNA polimerasi RNA-dipendente e la regione terminale della proteina del capsidico VP2 e set di primer specifici per enterovirus umani per la regione del 5' non codifi-

cante e la regione VP1 del capsidico.

Lo studio delle similarità molecolari è fondamentale per la messa a punto di una diagnostica differenziale rapida e può dare indicazioni circa la possibilità di trasferimenti da umani ad animali e viceversa.

P188

MUTAZIONI NEL GENE HBV POLIMERASI ASSOCIATE A RESISTENZA ALLA LAMIVUDINA IN PAZIENTI CON EPATITE B

Leone R.A., Minchella P., Nisticò S., Potente G.I., Caruso D., Camerino M., Nicolazzo A., *Petronio A., Luciano A.

U.O. Microbiologia e Virologia, *U.O. Malattie Infettive, Azienda Sanitaria N. 6, Via Perugini, 88046 Lamezia Terme (CZ)

Scopo del lavoro.

Valutare la presenza di mutazioni associate a resistenza alla lamivudina nel gene che codifica la polimerasi HBV in pazienti con Epatite B Cronica (CH-B), monitorati presso la nostra U.O.. La lamivudina, analogo nucleosidico inibitore della trascrittasi inversa di HBV e quindi della replicazione virale, riduce rapidamente il livello sierico di HBV-DNA; la terapia prolungata oltre sei mesi, tuttavia, può determinare selezione di mutanti resistenti. La lamivudino-resistenza è associata a mutazioni nel codone 552 del gene POL, per cui nel sito attivo della trascrittasi inversa (YMDD), sequenza di Tirosina (Y), Metionina (M), Acido Aspartico (D), Acido Aspartico (D), la Metionina è sostituita con Isoleucina (YIDD) o Valina (YVDD). Recenti studi hanno dimostrato che tali mutazioni possono essere riscontrate anche in pazienti con CH-B mai trattati prima con antivirali.

Materiali e metodi.

Abbiamo considerato n. 40 pazienti con CH-B, 22 maschi e 18 femmine, con età media circa 43 anni, 22 dei quali in trattamento con lamivudina da più di un anno. Sono stati utilizzati i seguenti metodi: A) HBV-DNA: PCR quantitativa (Cobas Amplicor HBV Monitor, Roche Diagnostics); B) Mutanti polimerasi: ibridazione inversa su strips di nitrocellulosa (LiPA), dopo amplificazione del domain B e C della regione HBV polimerasi, con sonde specifiche che rivelano mutazioni di resistenza genotipica nei codoni 528, 552 e 555 (INNO-LiPA HBV DR, Innogenetics).

Risultati. In 6 dei 22 pazienti in trattamento con lamivudina sono state individuate mutazioni; in particolare in 4 sono state rilevate popolazioni miste di ceppi selvaggio e mutanti (M552I) e (M552V / M552I) mentre in 2 solo popolazione mutata (M552I). In nessuno dei 18 pazienti mai trattati con antivirali è stata rilevata mutazione nel codone 552, tuttavia in 2 è stata riscontrata mutazione nel codone 555 (V555I) associata, secondo diversi studi, a resistenza al famciclovir, un altro analogo nucleosidico. Inoltre in nessuno dei 40 pazienti è stata rilevata mutazione nel codone 528.

Discussione e Conclusioni.

La precoce determinazione di mutazioni associate a resistenza farmacologica è di grande interesse clinico, soprattutto dopo l'introduzione di nuovi farmaci, alternativi alla lamivudina. In conclusione, un metodo rapido per la rivelazione di resistenza genotipica ai farmaci, sicuramente vantaggioso per programmare il regime terapeutico ottimale, può essere utilizzato in aggiunta alle altre procedure diagnostiche prima e durante la terapia.