

162

NUOVO SAGGIO FISH PER LA RICERCA DEL DNA DI HPV COMBINATO AD IHC CHEMILUMINESCENTE PER LA QUANTIFICAZIONE DI P16^{INK4A} IN LESIONI CERVICALI

Ambretti S.^{1,2}, Venturoli S.², Mirasoli M.³, Cricca M.^{2,4}, Santini D.⁵, Guardigli M.³, Rizzoli M.³, Zerbini M.², Musiani M.²

¹Scuola di specializzazione in Microbiologia e Virologia, Università di Bologna,

²D.M.C.S.S. Sez. di Microbiologia, Università di Bologna,

³Dip. di Scienze Farmaceutiche, Università di Bologna,

⁴C.R..R.E.M., Sez. di Microbiologia, Osp. S.Orsola-Malpighi, Via Massarenti 9, 40138 Bologna

⁵D.C.S.R.I. Sez. di Anatomia Patologica, Osp. S.Orsola-Malpighi, Via Massarenti 9, 40138 Bologna

Introduzione. In lesioni neoplastiche della cervice uterina e di altri distretti, associate all'infezione da Papillomavirus umani (HPV) ad alto rischio oncogeno, l'espressione della p16^{INK4A}, una proteina coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare, risulta aumentata. Tale fenomeno è dovuto all'inattivazione funzionale, da parte dell'oncoproteina virale E7, di pRb, che normalmente mantiene bassi i livelli della p16^{INK4A} attraverso un meccanismo di feedback negativo.

Metodi. Allo scopo di valutare l'associazione tra HPV, espressione della p16^{INK4A} e grado delle lesioni cervicali, abbiamo messo a punto un saggio di ibridazione in situ con rivelazione fluorescente (FISH) per la ricerca del DNA di HPV, combinato ad una tecnica di immunistochemica (IHC) per la quantificazione della p16^{INK4A}.

Per la rivelazione della IHC è stato scelto un substrato chemiluminescente che, oltre a garantire alti livelli di sensibilità e specificità, consente un'acquisizione e una rielaborazione del segnale automatizzate e quindi oggettive. La valutazione quantitativa della p16^{INK4A} prevede uno score nel quale sono considerati sia l'intensità media del segnale positivo sia la percentuale di epitelio in cui si ha sovraespressione della proteina.

Il saggio è stato applicato all'analisi di 85 campioni istologici provenienti da biopsie cervicali: 37 lesioni benigne, 20 neoplasie intraepiteliali cervicali di basso grado (CIN1), 28 di alto grado (CIN2-3).

Risultati. L'analisi dei campioni ha evidenziato un aumento delle percentuali di positività sia per HPV, sia per p16^{INK4A}, passando dalle lesioni benigne (rispettivamente 43.4 e 8.1%), ai CIN1 (60.0 e 75.0%), ai CIN2-3 (85.7 e 96.4%). Dal punto di vista quantitativo, l'espressione della p16^{INK4A} risulta essere significativamente più elevata nelle lesioni di alto grado (score medio 1,23) rispetto alle lesioni di basso grado (score medio 0,64).

Discussione. La sovraespressione della p16^{INK4A} risulta avere una specificità maggiore, rispetto alla positività al DNA di HPV, nel riconoscimento delle lesioni neoplastiche HPV-correlate. Inoltre, i dati quantitativi confermano come l'espressione della p16^{INK4A} aumenti con un andamento che segue il grado istologico della lesione cervicale.

La tecnica da noi messa a punto si propone quindi come un utile mezzo diagnostico in grado di rilevare in un unico campione la presenza del DNA virale e il livello di espressione di una proteina che ha significato di marker di progressione neoplastica.

163

USO DELLA BIOLOGIA MOLECOLARE NELLA DIAGNOSI DELLE SEPSI IN PAZIENTI IN ETÀ PEDIATRICA: DESCRIZIONE DI 3 CASI

Bandettini R., Ricagni L., Pescetto L., Ferrari P., Fenu ML., Formiga A., Pellettieri A., di Marco E.

*Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, Ist. G. Gaslini, Genova.

Introduzione. Le sepsi nei pazienti in età pediatrica richiedono un tempestivo intervento diagnostico, terapeutico. La velocità è essenziale. La biologia molecolare mette a disposizione test che accorciano i tempi nella identificazione degli agenti eziologici permettendo quindi una rapida correzione della terapia antibiotica. In questo lavoro descriviamo 3 casi di sepsi ricoverati nel nostro Istituto tra il 2005 ed il 2006, in cui l'uso della PCR è stato di estremo aiuto.

Materiali e metodi.

- 1) Bambino di 22 mesi all'ammissione presenta un quadro clinico pseudo-influenzale, con faringo-tonsillite essudativa, rarissime maculo-papule sull'addome, assenza di segni meningei, leucocitosi neutrofila e C-RP negativa. Con la real time PCR viene identificata in meno di 2 ore *N.meningitidis* sia in campioni di sangue che di urine, confermata a distanza di 48 ore dall'emocoltura.
- 2) Bambino di 1 anno presenta all'ammissione uno stato soporoso, con febbre e lesioni ecchimotiche cutanee agli arti inferiori successivamente diagnosticate come purpura fulminans. La ricerca di antigeni urinari dà esito positivo per *S.pneumoniae*. confermato con la nested PCR su sangue, mentre le emocolture danno esito negativo in quanto già in terapia con ceftriaxone.
- 3) Bambina di 8 anni presenta all'ammissione uno stato di shock settico con petecchie e manifestazioni ecchimotiche diffuse. Con la real time PCR viene segnalata la positività per *N.meningitidis*, la ricerca degli antigeni urinari dà esito aspecifico e le emocolture sono negative in quanto già in terapia con ceftriaxone.

Conclusione. Le tecnologie messe a disposizione dalla biologia molecolare migliorano la qualità del lavoro del microbiologo e del clinico. Come sappiamo dalla letteratura la PCR è dotata di elevata sensibilità e specificità, non risente della eventuale terapia antibiotica già somministrata o in corso e permette una rapida identificazione con possibilità da parte del clinico di iniziare immediatamente una terapia mirata.