

comunicazioni orali

SESSIONE 9

Biotechnologie emergenti nella diagnostica microbiologica e virologica

Venerdì 11 giugno 2004, 9.00-13.00, Sala F

CO9.1

ANALISI DELL'INTEGRAZIONE DEL DNA DI HPV16 IN CAMPIONI CERVICALI MEDIANTE PCR QUALITATIVA E QUANTITATIVA

Cricca M., Venturoli S., Ambretti S., Bonvicini F., Gallinella G., Musiani M., Zerbini M.

Dipartimento di Medicina Clinica, Specialistica e Sperimentale - Divisione di Microbiologia, Università di Bologna, Via Massarenti 9, 40138

Obiettivi:

L'integrazione del DNA di HPV16 nel genoma umano è un evento implicato nella progressione delle lesioni preneoplastiche a carcinoma cervicale invasivo. L'integrazione comporta l'interruzione delle ORF E1/E2 e la conseguente sovraespressione delle oncoproteine E6 ed E7. Studi recenti hanno dimostrato che l'integrazione non è sempre un evento tardivo nella progressione dell'infezione e che lo stato integrato dell'HPV16 in CIN di basso grado ha un valore predittivo positivo per la progressione neoplastica.

Nel presente studio sono stati allestiti saggi di PCR qualitativa per mappare le regioni delle ORF E1/E2 più frequentemente interrotte e saggi quantitativi per determinare lo stato fisico del DNA di HPV16 in lesioni cervicali di diverso grado e in carcinomi microinvasivi.

Materiali e metodi:

I campioni citologici sono stati analizzati mediante un saggio di PCR qualitativa per l'amplificazione di 4 frammenti overlapping che coprono l'intera ORF E1 e di due frammenti overlapping che coprono l'intera ORF E2.

Successivamente sono stati allestiti saggi di PCR real time per l'amplificazione di un frammento di 242 bps interno al gene E2, nella regione più frequentemente

interrotta (hinge region) e di un frammento di 130 bps interno al gene E6.

Risultati:

Il 95% dei campioni sono risultati positivi ad entrambe le ORF (E1/E2) in PCR qualitativa, mentre il 5% dei campioni sono risultati negativi per l'estremità 3' della ORF E1 e per l'intera ORF E2.

La quantificazione relativa dell'E2 rispetto all'E6 ha consentito di determinare lo stato fisico di HPV16 confermando l'integrazione del DNA nel 5% dei campioni e dimostrando la presenza di DNA virale, sia allo stato episomiale sia allo stato misto, nel rimanente 95% dei campioni.

Conclusioni:

I saggi di PCR qualitativa e quantitativa da noi messi a punto, permettono di determinare lo stato fisico e la carica virale in pazienti con infezione da HPV16, parametri questi che consentono di valutare in termini prognostici la progressione della lesione o la clearance virale.

CO9.2

TECNICA DI AMPLIFICAZIONE REAL TIME NEI TUMORI ED IN NUOVE ENTITÀ PATOLOGICHE HHV8-ASSOCIATI

Tedeschi R., Bidoli E.*, Bortolin M.T, Pratesi C., D'Andrea M., Averna P., Varaschin P., Crepaldi C., Simonelli C.°, De Paoli P.

*Unità Complessa di Microbiologia-Immunologia e Virologia, *Epidemiologia, °Oncologia Medica & AIDS, Centro di Riferimento Oncologico, IRCCS, Aviano.*

Introduzione e Scopo. HHV-8 è l'ultimo Herpesvirus, identificato nel 1994 in biopsie di pazienti AIDS con sarcoma di Kaposi (KS). Oltre al KS, è stata descritta l'associazione del virus con due distinte patologie linfoproliferative, quali Primary Effusion Lymphoma

(PEL) e Multicentric Castleman Disease (MCD) e, di recente, con linfomi solidi associati a MCD o AIDS-KS (LS). Controverso è il ruolo di HHV8 nel Mieloma Multiplo (MM). Scopo dello studio è stato quello di valutare e confrontare la viremia HHV8 nei pazienti con diversa patologia HHV8-relata e di correlarla con altri parametri virologici (viremia EBV, HIV), sierologici (reattività anticorpale HHV8) e immunologici (conta CD4).

Materiali e Metodi.

Campioni di plasma, siero e PBMCs sono stati raccolti durante il follow-up clinico in 40 pazienti KS-AIDS, 4 KS classici, 5 PEL, 8 MCD, 4 LS (3 HIV+, 1 HIV-). Uno studio prospettico per l'insorgenza di MM (1961 soggetti con 250 casi) è anche stato valutato. La viremia HHV8 ed EBV è stata valutata con metodica real time PCR (Tedeschi et al J Clin Microbiol 2001), la viremia HIV mediante metodica b-DNA (Bayer) e la conta dei CD4 in citofluorimetria, la sierologia HHV8 in IFA.

Risultati.

Alta viremia plasmatica HHV8 era presente nei KS sia prima che durante HAART (mediana, 8998 e 12270cp/ml); i livelli di HHV8 DNA correlavano con livelli di HIV RNA (OR:5.40, 95%CI:1.54-18.98) e con la conta CD4 (OR:7.24, CI95%:1.30-40.35). Nei PEL era presente viremia HHV8 elevata allo sviluppo della malattia in 5/5 pz (mediana, 10284cp/ml) e durante il follow-up clinico (mediana, 2078cp/ml), osservando una correlazione con un progressivo calo dei CD4 ($p < 0.01$). EBV DNA era presente in 3/5 pz (mediana, 3196 cp/ml) e in 4/5 pz durante il follow-up (mediana, 598 cp/ml). Negli 8 MCD erano presenti livelli HHV8 DNA più elevati rispetto EBV DNA (mediana 4350cp/ml e 40cp/ml, rispettivamente). Le caratteristiche istologiche, virologiche e cliniche dei LS sono in corso di studio. Reattività HHV8 era presente in 7/1961 pz dello studio MM senza HHV8 viremia rilevabile.

Considerazioni Conclusive.

La determinazione molecolare di HHV8 permette di associare nuove entità patologiche a questo virus, rappresenta uno strumento utile nel follow-up clinico dei pazienti con tumori HHV8 associati e consente di studiare le interazioni patogenetiche con altri virus tumore-associati.

CO9.3

DIAGNOSTICA DIFFERENZIALE PRECOCE DEL SARS CORONAVIRUS CON METODICA MICRO-ARRAYS NELLE SINDROMI ACUTE RESPIRATORIE

Giannattasio A., *Marzo C., *Guarino C., Falco E., **De Montis A., **Lauterio C., Alterio A., **Scarpati S., *Bellitti F., Smeraglia R.**

Virologia P.O. "C. Ascalesi": Direttore Prof. Riccardo Smeraglia - A.S.L. Napoli 1,

**I Clinica Pneumologica II Università di Napoli P.O. Monaldi,*

*** BCS Biotech SpA Laboratori di Ricerca e Sviluppo Cagliari,*

****Ospedale S. Maria delle Grazie Pozzuoli (NA) - A.S.L. Napoli 2*

Lo scopo della nostra ricerca è quello di poter effettuare una tempestiva diagnosi differenziale per il SARS Coronavirus nei confronti degli altri virus (Influenza A, Influenza B, Parainfluenza 1-2-3, RSV, Adenovirus) responsabili di sindromi respiratorie acute.

Lo studio in esame è stato condotto su 12 pazienti affetti da varie patologie respiratorie, utilizzando il metodo con Micro-Arrays. Nei primi 5 pazienti la ricerca dei virus respiratori, compreso il Coronavirus SARS, è stata eseguita su: liquido di lavaggio bronco-alveolare (BAL), su broncoaspirato e su siero; nei restanti 7 pazienti l'esame è stato effettuato solo su campioni di siero.

Il metodo con Micro-Arrays, o DNA/RNA chips, è un sistema diagnostico innovativo che consente di identificare simultaneamente il genoma (o una sequenza nota) degli 8 virus potenzialmente responsabili della sindrome respiratoria acuta. La caratteristica peculiare del metodo è l'ibridizzazione del genoma virale, o parte di esso, all'interno di pozzetti di circa 2x2 cm. Tale metodica permette l'identificazione dei virus in questione dopo 1-2 giorni dall'infezione.

Dei primi 5 pazienti esaminati: 2 sono risultati positivi per RSV nel BAL e nel broncoaspirato, uno positivo per RSV nei tre liquidi biologici presi in esame, uno positivo per Influenza A nel BAL e nel broncoaspirato e uno è risultato completamente negativo. Per quanto concerne gli altri 7 sieri: 2 sono risultati positivi all'Adenovirus, uno positivo a Parainfluenza 1 e Adenovirus, uno positivo a RSV e Influenza B, uno debolmente positivo all'RSV e 2 positivi all'RSV.

I dati da noi ottenuti dimostrano che il metodo con Micro-Arrays permette di porre una rapida diagnosi differenziale per il SARS Coronavirus nei confronti degli altri virus respiratori. Ci piace sottolineare, però,