

(basaloidi/bowenoidi), 10 sono risultati positivi al DNA di HPV con una netta prevalenza del genotipo 16 (9/10). Il carcinoma squamocellulare infiltrante bowenoide è risultato positivo al DNA di HPV 35. I 7 VIN di tipo differenziato e i 16 carcinomi infiltranti cheratinizzanti sono risultati negativi.

I nostri dati quindi confermano la stretta associazione tra infezione da HPV ed alcuni tipi istologici di carcinomi squamosi e VIN indifferenziati riscontrabili nella donna giovane. Inoltre l'assenza di DNA di HPV nei VIN differenziati e nei carcinomi infiltranti cheratinizzanti della donna anziana supportano la diversa eziologia dei carcinomi della vulva: eziologia virale HPV correlata per i carcinomi squamosi basaloidi e bowenoidi ed eziologia non virale per i carcinomi cheratinizzanti.

G023

VALUTAZIONE ANALITICA DI UN SAGGIO DI REAL TIME PCR PER IL MONITORAGGIO DELL'INFEZIONE DA VIRUS DI EPSTEIN BARR

Bortolin M.T., Tedeschi R., Zanussi S., Pratesi C., Bidoli E.*, De Paoli P.

*U.O. di Microbiologia, Immunologia e Virologia e *Epidemiologia, Centro di Riferimento Oncologico, Istituto Nazionale Tumori-IRCCS, via Pedemontana Occidentale, 12, 33081 Aviano (Pordenone)*

Introduzione e scopo. La valutazione quantitativa della viremia EBV è utile per monitorare pazienti a rischio di riattivazione virale. Scopo dello studio è stato approfondire la performance analitica di un saggio Real Time PCR per il dosaggio di EBV e confrontare tale metodo con uno non cinetico.

Materiali e metodi. Il sistema Real Time PCR (ABI PRISM 7900-Applied Biosystem) utilizza una sonda TaqMan che amplifica un frammento di 65 pb del gene LMP-1. La curva standard è stata costruita su diluizioni seriali di DNA di cellule Namalwa (range: 4×10^3 - 4×10^6 copie EBV/ml). Campioni corrispondenti a 2.5-5-10 copie in 8 repliche e campioni nel range 2.5-2 x 10^6 copie in 6 repliche sono stati utilizzati per valutare rispettivamente sensibilità e riproducibilità. Sono stati poi dosati 5 campioni di pazienti con mononucleosi infettiva e 2 di carcinoma indifferenziato del nasofaringe, precedentemente dosati con un metodo non cinetico di PCR (Pratesi et al., J Clin Virol, in press).

Risultati. La sensibilità è stata del 100% a 10 copie, dell'83% a 5 copie e del 67% a 2.5 copie. I risultati sulla riproducibilità sono stati riportati in tabella:

Copie EBV	Riproducibilità			
	Intra-assay		Interassay	
	% CV	Media	% CV	Media
2.5	37.6	6.9	*	*
5	60.7	13.2	69.4	9.6
20	40.9	26.9	60.6	22.7
200	6.2	188.2	14.1	176.6
2000	7.1	1939.3	1.3	2119.7
20000	0.1	25363.6	0.7	24398.1
200000	5.2	246163.3	2.4	226534.9
2000000	5.6	2583915.0	8.7	2415883.0

Correlazione di Spearman (p<0.01)

Valori di viremia più elevati (1173-46328 copie/ml) sono stati riscontrati rispetto al dosaggio precedente (450-5000 copie EBV/ml).

Conclusioni. La metodica Real Time PCR è molto sensibile, riproducibile e consente di processare numerosi campioni in tempi contenuti e con minore laboriosità rispetto alla PCR ordinaria. Queste caratteristiche analitiche e l'eliminazione delle procedure post-PCR, la rendono di facile applicazione e supportano la sua utilità nella valutazione del carico virale per monitorare pazienti che sono a rischio di riattivazione di EBV.

G024

CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICA DI HIV-1 ISOLATO DURANTE UN'INFEZIONE PRIMARIA ASSOCIATA AD UNA SINDROME EMOFAGOCITICA SEVERA

Castilletti C., Capobianchi M.R.*, Carletti F., Calcaterra, S., Preziosi R#, Bernardini G#, Perno C.F., Armignacco O#.

Istituto Nazionale per le Malattie Infettive "L. Spallanzani", Roma #Divisione Malattie Infettive, Ospedale Generale Belcolle, Viterbo

L'infezione primaria sintomatica da HIV è accompagnata da una più rapida progressione clinica della malattia rispetto all'infezione asintomatica.

Abbiamo voluto caratterizzare biologicamente un isolato virale proveniente da un soggetto con una sindrome emofagocitica severa in infezione primaria da HIV-1, comparando le proprietà del virus trasmesso con quelle del virus del donatore.

L'esame obiettivo di un ventisettenne, ricoverato in Ospedale per febbre elevata e cefalea, evidenziava condizioni generali compromesse, esantema maculo-papuloso diffuso, linfadenomegalia, epatosplenomegalia; L'indagine epidemiologica non riferiva fattori di rischio per HIV e la ricerca degli anticorpi anti-HIV risultava negativa. Una biopsia linfonodale mostrava una corticale ridotta con rari follicoli, marcata proliferazione di istiociti con frequenti segni di eritrofagocitosi. Dopo 4 giorni compariva candidosi orale; l'antigene HIV p24 risultava positivo, la viremia molto elevata. E' stata diagnosticata sindrome emofagocitica in paziente con infezione acuta da HIV ed intrapresa terapia antiretrovirale. A 5 giorni dall'inizio della HAART, la sintomatologia d'esordio regrediva, e nei tre mesi successivi la viremia si azzerava.

E' stata individuata la fonte dell'infezione ed isolato il virus dal plasma e dai linfomonociti sia del donatore che del ricevente mediante co-coltura di PBMC privati dei CD8+.

Le caratteristiche biologiche dei virus isolati sono risultate indistinguibili sia per l'efficienza di replicazione (dosaggio della p24 nel sovrantante), che per l'utilizzo del corecettore (CCR5) determinato mediante infezione di cellule U87-CD4 esperimenti CCR5 o CXCR4.

Su entrambi gli isolati è stato dimostrato il polimorfismo I93L del gene della proteasi.

L'analisi molecolare condotta sulla regione del V3 mediante clonaggio e successiva analisi filogenetica ottenuta analizzando le correlazioni intra- ed inter-paziente mediante albero filogenetico "neighbour-joining program" ha dimostrato, nel donatore, la presenza di quasispecie altamente divergenti, mentre, nel ricevente una quasispecie virtualmente omogenea, fenomeno frequentemente dimostrato durante le fasi precoci dell'infezione da HIV, probabilmente dovuto ad una trasmissione a "collo di bottiglia".

La popolazione uniforme presente nel ricevente corrispondeva ad una popolazione minore delle quasispecie del donatore.

Le proprietà biologiche del virus isolato, insieme alla sequenza aminoacidica della regione del V3 (fenotipo M-