

(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:  $4 \times 10^3$ - $4 \times 10^6$  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-cultura 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-

R5), non spiegano l'aggressività del decorso dell'infezione, che è stata prontamente controllata dalla terapia antiretrovirale.

## G025

### VALUTAZIONE DI 500 SIERI POSITIVI A BASSO TITOLO PER HCV-Ab CON METODO AUTOMATICO IN CHEMILUMINESCENZA

Cecchini F., Gagetta M., Mauri A., Turrini D., Guagnellini E.

Laboratorio di Biochimica Clinica e Microbiologia, Azienda Ospedaliera San Paolo, Milano.

Scopo di questo lavoro è di verificare, per intervalli predefiniti, l'accuratezza dei risultati del test antiHCV eseguiti sul sistema ORTHO Vitros ECi (test di screening) verso il metodo LIA - InnoGenetic (test di conferma) e di definire le procedure operative da adottare al riscontro di sierii antiHCV analiticamente critici. I dati riportati sono riferiti al periodo Febbraio 2001 - Febbraio 2003. In questo periodo sono stati eseguiti 20860 test antiHCV su ECi (cut off dichiarato  $\geq 1$ ) e tutti i campioni che hanno dato un risultato compreso tra 0.8 - 20, sono stati ritestati con metodo LIA. Di tutti i campioni eseguiti nell'arco del periodo indicato, ben 509 sono stati i campioni confermati con LIA mentre i restanti 20351 non sono stati rianalizzati in quanto non cadevano nell'intervallo da noi scelto. Per meglio valutare l'accuratezza dei risultati di ECi, l'intervallo 0.8 - 20 è stato suddiviso in tre classi: 0.8 - 5; 5 - 10; 10 - 20. Per la prima classe sono stati ritestati 254 campioni che hanno dato i seguenti risultati in LIA: 117 negativi, 96 indeterminati, 41 positivi. Per la seconda classe sono stati testati con metodo LIA 102 campioni che si sono così distribuiti: 57 positivi, 34 indeterminati, 11 negativi. Infine per l'ultima classe, 153 sono stati i campioni ritestati di cui 136 si sono confermati positivi, 7 negativi e 10 indeterminati. L'analisi del  $\chi^2$  ha rilevato una differenza statisticamente significativa tra i due metodi ( $p = 0.001$ ) per le prime due classi (0.8 - 5 e 5 - 10). Tale differenza potrebbe essere legata alla diversa sensibilità/specificità tra test di screening (ECi) e test di conferma (LIA). Alla luce dei risultati ottenuti, riteniamo necessaria l'esecuzione di un test di conferma per tutti quei campioni che cadono nell'intervallo 0.8 - 10.

## G026

### CANCRO DEL POLMONE ED INFEZIONE DA HPV

Ciotti Marco<sup>1</sup>, Paba Piepaolo<sup>1</sup>, Ambrogio Vincenzo<sup>2</sup>, Benedetto Arrigo<sup>1</sup>, Mineo TC<sup>2</sup>, Cartesio Favalli<sup>1</sup>.

Università di Roma Tor Vergata, Policlinico Universitario

<sup>1</sup> Laboratorio di Microbiologia e Virologia Clinica,

<sup>2</sup> Dipartimento di Chirurgia Toracica Viale Oxford, 81 00133 Roma

Il tumore al polmone è la principale morte per cancro nei paesi occidentali. Il fumo di sigaretta e l'inquinamento ambientale sono considerati i più importanti fattori di rischio nello sviluppo del cancro polmonare anche se non possono spiegare la totalità dei decessi. Quindi altre cause, oltre quelle chimiche, sono implicate nella cancerogenesi polmonare. Venti pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) sottoposti ad intervento chirurgico presso il

Dipartimento di Chirurgia Toracica del Policlinico Universitario Tor Vergata sono stati arruolati nello studio. I tumori sono stati classificati secondo il sistema TNM ed erano tutti allo stadio 1A. L'istologia tumorale era la seguente: 11 carcinomi squamosi, 6 adenocarcinomi e 3 carcinomi a grandi cellule. Mediante metodiche molecolari (PCR e Ibridazione inversa) abbiamo ricercato il virus del Papilloma umano (HPV) nelle sezioni tumorali fissate in paraffina dei suddetti casi. Tessuto polmonare sano è stato incluso come controllo. Le nostre indagini hanno mostrato la presenza del virus in 9 casi su 20 (45%) e in tutti i casi positivi, tranne uno, erano presenti da tre a cinque genotipi contemporaneamente (16,18,31,45,66 e 68). La presenza del virus non era correlata al tipo istologico del tumore anche se i soggetti con carcinoma squamoso hanno presentato una riduzione della sopravvivenza rispetto a quelli con adenocarcinoma e carcinoma a grandi cellule. Questi dati preliminari suggeriscono che l'HPV può avere un ruolo nella cancerogenesi polmonare.

## G027

### ANALISI DELLO STATO FISICO DEL DNA DI HPV16 IN LESIONI CERVICALI DI ALTO GRADO MEDIANTE UN SAGGIO DI REAL TIME PCR

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

Dipartimento di Medicina Clinica, Specialistica e Sperimentale, Sez. di Microbiologia, Università di Bologna, Via Massarenti 9, 40138 Bologna

L'integrazione del DNA di HPV nel genoma umano è un evento importante nella progressione delle lesioni preneoplastiche a carcinoma cervicale invasivo. Il passaggio dalla forma episomiale a quella integrata comporta più frequentemente la distruzione o delezione delle ORF E2 ed E1; tali eventi determinano una sovraespressione delle oncoproteine E6 ed E7 responsabili della trasformazione maligna.

Per analizzare, in lesioni preneoplastiche, la presenza di DNA di HPV 16 allo stato episomiale, misto e integrato sono stati allestiti saggi di PCR classica e di PCR real time.

Per lo studio sono stati analizzati campioni citologici eso-endocervicali provenienti da 10 pazienti, con CIN di alto grado e carcinoma microinvasivo, sottoposte a follow up postconizzazione.

Il DNA estratto dai campioni è stato sottoposto ad una prima analisi, mediante un saggio di PCR classica, che prevede l'amplificazione totale delle ORF E2 ed E6 allo scopo di discriminare le forme integrate da quelle miste ed episomiali. Successivamente i campioni sono stati analizzati mediante un saggio di PCR real time.

Per l'allestimento del saggio di PCR real time in formato SYBR Green sono state selezionate delle coppie di primer specifiche per E2 ed E6 in grado di amplificare frammenti di 150-300 paia di basi. Mentre la quantificazione di E6 permette di determinare la carica virale, la quantificazione relativa dell'E2 rispetto all'E6 fornisce il dato sullo stato fisico del DNA di HPV16: misto o episomiale.

Delle 10 pazienti analizzate il 20% mostravano l'HPV16 allo stato episomiale (2 CINIII), il 60% allo stato misto (5 CINIII e 1 carcinoma microinvasivo) e il 20% allo stato integrato (1 CINIII e 1 carcinoma microinvasivo).

L'applicazione clinica della tecnica di PCR real time, sia per lo studio dello stato fisico del DNA di HPV16 sia per la determinazione quantitativa del carico virale, risulta essere un valido strumento per valutare la prognosi in pazienti con infezione persistente da HPV 16 e lesioni di alto grado.