

080

VALUTAZIONE DEL DOSAGGIO ABBOTT REAL-TIME HIV-1

Sestilli P.¹, Vecchi M.¹, Marinelli K.¹, F.R. Pulvirenti², Bagnarelli P.¹

¹Laboratorio di Virologia, Istituto di Microbiologia e Scienze Biomediche, Università Politecnica delle Marche, Ancona.
²Abbott Molecular, Roma

Introduzione. Abbiamo valutato le prestazioni del nuovo dosaggio Abbott Real-Time HIV-1 RNA quantitativo basato su estrazione automatica e chimica non esonucleasica (strand-displacement probe). Questo formato dovrebbe garantire robustezza nei confronti di eventuali "mismatches" presenti nella regione di ibridizzazione del probe. Il range dinamico del test (protocollo con volume iniziale di 1 mL) è compreso tra 40 e 10⁷ copie/mL. Lo studio è stato eseguito con volume iniziale di 0,5 mL (sensibilità 75 copie/mL). **Metodi.** Sono stati analizzati 79 campioni retrospettivi da 60 pazienti con infezione da HIV, il cui monitoraggio della carica virale era stato effettuato con il test b-DNA v.3 (Bayer). **Risultati.** Considerando il limite di sensibilità di 75 e 50 copie per Abbott e b-DNA rispettivamente, la concordanza qualitativa dei dosaggi era pari al 93,7% (74/79) con 3 risultati Abbott positivi/b-DNA negativi (range 80-154 copie/mL) e 2 bDNA positivi/Abbott negativi (277 e 811 copie/mL). Vi erano inoltre 3 campioni con risultato Abbott <75 copie/mL ma con target rilevato, che erano <50 copie/mL con b-DNA. Per i 59 campioni quantificabili con entrambi i metodi, la retta di regressione lineare tra i valori Abbott (y) e b-DNA (x) aveva equazione $y = 0,921x + 0,573$ ($r = 0,882$). Il 71% e il 93% dei campioni mostrava una differenza compresa entro 0,5 ed 1,0 log rispettivamente, con una differenza media Abbott-bDNA di 0,27 log (DS=0,48log). Analizzando separatamente i campioni in base alla provenienza geografica, differenza media e coefficiente di correlazione r erano 0,12 log/0,834 per i soggetti di nazionalità italiana e di 0,41 log/0,967 per quelli non italiani (in prevalenza africani). **Conclusioni.** Il dosaggio Abbott Real-Time ha mostrato una buona correlazione ed una sostanziale equivalenza con il test b-DNA v.3. La differenza media dei valori osservati sembra essere influenzata dalla provenienza geografica dei campioni.

081

SVILUPPO DI UNA PCR QUANTITATIVA COMPETITIVA PER LA DETERMINAZIONE DELLA CARICA VIRALE DEL CITOMEGALOVIRUS E CONFRONTO CON L'ANTIGENEMIA, LA VIREMIA E IL NASBA

¹Bergallo M., ¹Costa C., ¹Merlino C., ¹Forgnone F., ¹Piasentin E., ¹Negro Ponzi A., ²Segoloni G. P., ¹Cavallo R.

¹Dipartimento di Sanità Pubblica e Microbiologia, Laboratorio di Virologia, Università di Torino;

²Dipartimento di Medicina Interna, Unità Trapianto Rene, Ospedale Molinette, Torino.

Introduzione. L'infezione da HCMV rappresenta la princi-

pale causa di morbilità e mortalità in seguito a trapianto renale. Le principali tecniche di diagnosi virologica sono: la dimostrazione diretta dell'antigene tardivo pp65 dell'HCMV nei granulociti polimorfonucleati circolanti (PMNL) (Antigenemia) e la dimostrazione dell'antigene immediato-precoce p72 nei fibroblasti di polmone embrionario umano infettati con i granulociti circolanti (Viremia). Sono state inoltre introdotte tecniche di biologia molecolare per la dimostrazione degli acidi nucleici virali nel sangue periferico: la PCR quantitativa per la dimostrazione della carica virale nel sangue periferico e la dimostrazione degli RNA messaggeri (m-RNA) nei leucociti circolanti.

Metodi. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di sviluppare una PCR quantitativa-competitiva (QC-PCR) per la valutazione della carica virale dell'HCMV, basata sulla co-amplificazione del DNA bersaglio e di un competitore, con funzione di standard interno.

Sono state effettuate prove di validazione del sistema bersaglio-competitore e la quantificazione del DNA dell'HCMV è stata effettuata mediante analisi densitometrica delle migrazioni elettroforetiche.

Questa metodica validata è stata quindi utilizzata per quantificare l'HCMV-DNA in 40 pazienti (28 maschi e 14 femmine) sottoposti a trapianto renale.

Tale approccio diagnostico in questi pazienti è stato infine correlato con altre metodiche utilizzate nel nostro laboratorio: l'antigenemia, la viremia e la ricerca dell'mRNA-pp67 mediante Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA).

Risultati. L'elaborazione statistica dei nostri dati ha permesso di rilevare una correlazione significativa tra il numero di PMNL positivi all'antigenemia e il numero di copie di genomi virali e tra la rilevazione dell'mRNA-pp67 e la carica virale e non significativa tra la viremia e la carica virale.

Conclusioni. In conclusione, nella nostra esperienza, l'impiego della QC-PCR da noi elaborata, affiancata all'antigenemia, può rappresentare un'ulteriore tecnica quantitativa per diagnosticare l'infezione attiva da HCMV in modo da iniziare il trattamento antivirale e monitorarne gli effetti nei pazienti immunodepressi.

082

VIRUS DI EPSTEIN-BARR E LINFOMI PRIMITIVI CUTANEI: VALUTAZIONE DELLA CARICA VIRALE MEDIANTE PCR QUANTITATIVA-COMPETITIVA (QC-PCR) SU BIOPSIA

Bergallo M., Costa C., Novelli M.* , Ponti R.* , Fierro M.T.* , Margio S., Bernengo M.G.* , Merlino C., Cavallo R.

Dip. Sanità Pubbl. e Microbiol., Lab. Virologia,

* Dip. Scienze Biom. Oncol. Umana, Sez. Dermatol., Lab. Immunopatol. Cutanea; Università di Torino

Introduzione. La micosi fungoide (MF) è il più frequente linfoma primitivo cutaneo a cellule T (CTCL) epidermotropo, generalmente confinato alla cute e con andamento clinico spesso indolente, mentre la sindrome di Sezary (SS) è un CTCL sistemico con prognosi nettamente peggiore. Per la loro eziopatogenesi, ancora ignota, sono stati suggeriti fattori genetici, ambientali e infettivi. Recentemente retrovirus quali HTLV-I e herpesvirus umani sono stati coinvolti sia per

la loro potenzialità di trasformazione oncogena diretta, sia perché capaci di infettare le cellule T e stabilire uno stato di latenza nei tessuti dell'ospite. Alcuni studi molecolari sul ruolo del virus di Epstein-Barr (EBV) nell'eziopatogenesi dei CTCL, hanno portato a risultati controversi anche a causa della diversa sensibilità delle tecniche impiegate.

Metodi. In questo lavoro è stata indagata retrospettivamente la presenza e l'eventuale carica virale di EBV in biopsie cutanee di pazienti con MF e SS utilizzando una PCR quantitativa-competitiva (QC-PCR) altamente sensibile (1-10 copie di EBV-DNA/reazione) messa a punto nel Laboratorio di Virologia. Tale metodica prevede la costruzione di una curva di taratura mediante l'utilizzo di uno standard esterno, un controllo interno di amplificazione e l'analisi densitometrica delle bande di amplificazione. Sono stati utilizzati campioni congelati di DNA di 17 pazienti con MF (11 M, 6 F; età mediana 63 anni, range 14-84), 4 con MF evoluta in linfoma ad alto grado (2 M, 2 F, età mediana 74 anni, range 59-82), 10 con SS (3 M, 7 F, età mediana 72 anni, range 46-84). Tutti i casi di MF e SS presentavano un riarrangiamento clonale dei geni del T Cell Receptor (TCR) catena γ . Come controllo sono stati esaminati i campioni di 8 pazienti con dermatosi cutanee reattive (4 M, 4 F, età mediana 64,5, range 33-79).

Risultati. Nessuno dei 21 pazienti con MF è risultato positivo per EBV-DNA. Nella SS, invece, erano positivi per EBV/DNA 7 pazienti su 10 (70%) con una carica media di 313,4 copie genomiche/ μ g di DNA estratto (range 1-2160 copie). In nessun paziente del gruppo di controllo è stata riscontrata la presenza di EBV-DNA.

Conclusioni. Nella nostra casistica appare una differenza altamente significativa tra MF e SS per quanto riguarda la positività per EBV-DNA nelle biopsie cutanee. Le differenze con i dati della letteratura, soprattutto per la MF, sono da valutare dal punto di vista delle tecniche impiegate. L'elevata percentuale di positività per EBV-DNA da noi riscontrata nella SS avvalorata i dati di letteratura che suggeriscono la rilevanza prognostica del riscontro del genoma di EBV nella cute, probabilmente correlato con un marcato deficit immunitario nel corso di forme severe di SS.

083

VALUTAZIONE IMPLEMENTAZIONE TORCH SU IMMULITE 2000 E CORRELAZIONE CMV IGM VERSO COBAS CORE II

Bernardi E., Pedroni M., Cocchi G., Ballerini C., Milanese B.

Laboratorio Patologia Clinica, A.O. Desenzano (BS)
PROO: Desenzano, Manerbio, Gavardo.

La finalità ad operare per il miglioramento della Qualità globale dell'Organizzazione dei Laboratori Aziendali, minimizzando l'impegno di personale e i costi di gestione mantenendo inalterata la qualità del dato, ci ha indotti ad implementare su Immulite 2000 (prodotto da DPC, distribuito da Medical Systems), sul quale già venivano effettuati dosaggi ormonali e marcatori tumorali, le ricerche anticorpali del complesso ToRCH prima eseguite su Cobas Core II (Roche). La comparazione tra i due strumenti eseguita per valutare la validità analitica dei test su Immulite ha fornito risultati sovrapponibili a quelli segnalati sulle schede tecniche dei metodi; abbiamo pertanto limitato l'esposizione ai risultati del test CMV IgM poiché di recente disponibilità.

I campioni scelti divisi in quattro gruppi secondo protocollo DPC:

1°-286 sieri di donne gravide scelti a caso, esaminati per CMV IgM su Immulite vs. Cobas. Risultati discrepanti riesaminati con Vidas (BioMérieux).

2°-34 campioni retrospettivi con IgM positive da infezione acuta da CMV preselezionati con Cobas, testati con Immulite; risultati discrepanti rianalizzati con entrambi i metodi.

3°-63 sieri retrospettivi con IgG positive, IgM negative preselezionati con Cobas.

4°-20 sieri con presenza di fattore reumatoide, 20 campioni positivi per IgM di EBV o Toxo.

E' stata calcolata: concordanza tra metodi, specificità, sensibilità relativa, valori predittivi positivi e negativi. I campioni positivi per fattore reumatoide ed EBV-Toxo IgM sono stati valutati separatamente in uno studio delle interferenze. Il nuovo kit CMV IgM DPC ha rivelato vs. Cobas Core: agreement 98,7%, sensibilità relativa 87,5%, specificità relativa 100%, PPV 100%, NPV 98,6%.

Possiamo concludere che le performance analitiche dei due Sistemi si sono dimostrate sovrapponibili, entrambe valide per lo screening di primo livello; inoltre l'alta produttività e l'accesso continuo del Sistema Immulite, ci ha permesso di: abbassare il TAT complessivo, razionalizzare la gestione campioni, migliorare l'intero processo operativo.

084

ESPOSIZIONE AL VIRUS DI EPSTEIN-BARR IN PAZIENTI DI ETÀ PEDIATRICA: STUDIO RETROSPETTIVO

Borelli A., Caruso V., Nistico S., Leone R.A., Minchella P., Potente G.I., Folino C., Camerino M., Caruso D., Carlei M.I., Piccoli M., Cerminara M.T., Luciano A.

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

Introduzione. Il virus di Epstein-Barr, isolato nel 1964 da una coltura cellulare di tessuto con linfoma di Burkitt, è diffuso in tutto il mondo ed è l'agente eziologico della mononucleosi infettiva. L'infezione primaria viene acquisita in età infantile ed è spesso asintomatica, mentre con l'aumentare dell'età si manifesta in più del 50% dei casi con linfadenopatia, epatosplenomegalia, linfocitosi, faringodinia; oltre l'80% della popolazione mondiale sopra i 30 anni mostra evidenza sierologica di esposizione al virus, che permane per tutta la vita. Scopo del lavoro è valutare retrospettivamente la presenza degli anticorpi anti-Viral Capsid Antigen (anti-VCA) IgG ed IgM nei pazienti in età pediatrica ricoverati ed esterni afferenti alla nostra U.O. nell'anno 2005.

Materiali e Metodi. Sono stati esaminati n. 309 sieri di pazienti pediatrici con sospetto diagnostico di mononucleosi infettiva (n. 158 fascia d'età 2-6 aa; n. 72 fascia 7-11 aa; n. 79 fascia 12-16 aa). Test utilizzati con metodo in immunofluorescenza (Ditta Focus Diagnostics, distribuiti dalla Ditta Alifax): a) test EBV VCA IgM RIFA, utilizza come substrato cellule di mammifero (circa 5-10%) che esprimono un VCA ricombinante; b) test EBV VCA IFA IgG, utilizza un substrato costituito da linfociti infettati dal virus. Per la ricerca delle IgM i sieri, adsorbiti per la rimozione delle IgG, sono stati testati alla diluizione 1:20; per la ricerca delle IgG alla