

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

diluizione 1:64 in soluzione tampone.

Risultati. Dei 309 sieri analizzati n. 127 (41,1 %) risultavano IgG positivi / IgM negativi; n. 31 (10,0 %) positivi sia per IgG che per IgM; n. 151 (48,9 %) negativi sia per IgG che per IgM, mentre nessuno era IgG negativo / IgM positivo. La distribuzione degli anticorpi per fasce di età è mostrata nella tabella.

Età/Tot	G+/M- (%)	G+/M+ (%)	G-/M- (%)	G-/M+
2-6 (158)	45 (28,5)	12 (7,6)	101 (63,9)	0
7-11 (72)	37 (51,4)	9 (12,5)	26 (36,1)	0
12-16 (79)	45 (57,0)	10 (12,7)	24 (30,4)	0
309	127	31	151	0

Conclusioni. Dai dati ottenuti risulta che nella fascia d'età 2-6 aa ben 63,9 % ancora non ha anticorpi anti-VCA IgG ed IgM, mentre nelle altre due fasce la percentuale è rispettivamente del 36,1 % e del 30,4 %. L'inserimento in comunità scolastica sembra favorire l'esposizione al virus.

085

EVALUATION OF A NEWLY DEVELOPED QUANTITATIVE TAQMAN HEPATITIS C VIRUS-RNA ANALYTE SPECIFIC REAGENT (ASR) ASSAY

Cannone M. C.; Pulvirenti F.R.²; Lucchi P.¹; Barberis M. C.¹;

¹Multimedica Multilab, Via Fantoli 16/15 20138 Milano, Italy,

²Abbott Molecular, Via Mar Della Cina 262, 20144 Roma, Italy,

Introduction. Limitations of current quantitative assays for HCV- RNA include insensitive lower limits of detection and lack of linearity in the upper range. Recently, a new ASR assay based on real-time RT-PCR developed by Celera Diagnostics (Alameda, CA, USA) and marketed in Europe by Abbott Molecular (Chicago, IL, USA), has become available.

Methods. We compared the Cobas Amplicor HCV Monitor 2.0 assay (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D) with the Celera-Abbott real time PCR, performed on the ABI PRISM 7000 SDS instrument on samples manually extracted by QIAamp viral RNA mini-kit.

Results. Passing-Bablok regression on 38 retrospective samples showed a correlation coefficient R² of 0.905, while the mean Celera- Monitor difference was - 0.87 log UI/mL. Accuracy, precision and linearity were verified with an Acrometrix panel (50; 500; 50,000; 500,000; 1,000,000 IU/mL), tested in reps of 2 for each level during 4 runs. The total CV (log IU/mL) ranged from 3.9% (1,000,000 UI/mL) to 8,0% (100 UI/mL). Linear regression line between Celera HCV-ASR measured log UI/mL (y) and expected log UI/mL (x) values had the equation: $y=0.996x - 0.366$ (R² =0.9969), while the detection rate at 50 IU/mL was 100% (8/8).

Conclusions. The new Celera HCV-RNA ASR assay showed excellent sensitivity, good precision and linearity, and correlated well with the test of reference. Although both assays express results in International Units, they were not interchangeable as a bias was noted, more pronouncedly in patient samples than in the panel. The wider dynamic range coupled with the exquisite sensitivity of the Celera HCV RNA assay allows a relevant gain of reportable results, avoiding reflexing samples to a further dilution step or to a qualitative test.

086

CASE REPORT: COMPARSA DI HBV DOPPIO-MUTANTE RESISTENTE ALL'ADEFOVIR DOPO TERAPIA PROLUNGATA CON LAMIVUDINA

Visca M.¹, Longo R.¹, Cappiello G.¹, Romano S.¹, Bernassola M.¹, Gallinaro V.², De Sanctis G.M.², Spanò A.¹

¹U.O.C. Microbiologia Virologia e Immunologia, Ospedale S. Pertini - Roma

²Dipartimento di Malattie Infettive e Tropicali, Policlinico Umberto I - Roma

Introduzione. Il trattamento dell'epatite B cronica con adefovir (ADV) può migliorare sensibilmente il profilo virologico e biochimico nei pazienti resistenti alla lamivudina (LAM).

L'uso prolungato di ADV porta allo sviluppo di resistenza (18% dopo 4 anni).

Caso clinico. Maschio italiano; 56 anni; diagnosi di infezione da HBV (genotipo D) dal 1987 (HBsAg+; HBeAg+; HBeAb-; HBcAb+; HBsAb-); transaminasi basali persistentemente elevate; negativo per HDV-Ab, HCV-Ab e HIV-Ab. Dopo 3 cicli di terapia (1991-1996) con interferone ricombinante (IFN α 2a) a giugno 2000 si instaura una terapia con LAM (HBV-DNA=2x10⁶copie/mL; epatite cronica attiva; indice di Knodell=3+1).

A marzo 2002 si documenta una resistenza genotipica a LAM (codone 204); la terapia viene sospesa per 7 mesi. Ad agosto 2003 si inizia il trattamento con ADV, interrotto a settembre 2004 per mancata risposta virologica e biochimica (HBV-DNA e ALT persistentemente elevate).

Alla sospensione si osserva un picco di ALT e a febbraio 2005 si instaura nuovamente la terapia con LAM avendo rilevato, a novembre 2004, la presenza di virus LAM-sensibile (rtM204, ma si individua la mutazione rtA181T).

Dopo 8 mesi si documenta la comparsa di mutazioni comuni associate a LAM-resistenza (rtL180M+rtM204V).

Si tenta nuovamente la terapia con ADV (dicembre 2005). Dopo solo 6 mesi si osservano 2 mutazioni associate ad ADV-resistenza (rtN236T+rtA181T).

Discussione. L'HBV ADV-resistente, con la sola mutazione rtN236T, conserva *in vivo* la suscettibilità a LAM rendendo possibile l'alternanza dei due trattamenti.

La mutazione rtA181T sembra legata a resistenza crociata ad ADV+LAM e può emergere durante un trattamento prolungato con LAM.

Un paziente con le mutazioni rtN236T+rtA181T non sembra quindi poter essere candidato alla terapia né con ADV né con LAM. Ratziu *et al.* (2006) descrivono un caso analogo con una risposta eccellente al tenofovir.

La possibilità di resistenza crociata rende fondamentale il monitoraggio frequente della suscettibilità farmacologica e la disponibilità di nuovi trattamenti antivirali.