

with the p16^{INK4a}/cyclin D/Rb pathway is inactivation of pRB through binding with E7 of the high-risk Human papillomavirus (HR-HPV). The role of p16^{INK4a} as a marker of HR-HPV and in diagnosis of CIN has been well established, but its predictive value in a) clearance of the virus after CIN treatment, and b) as a prognostic marker of cervical cancer was analysed for the first time.

Material and Methods: A series of 304 archival samples, including 125 squamous cell carcinomas (SCC) and 179 CIN lesions, were subjected to immunohistochemical staining for p16^{INK4a} antibody, and HPV testing using PCR with three primer sets (MY09/11, GP5⁺/GP6⁻, SPF). Follow-up data were available of 71 SCC patients, and 67 of the CIN lesions had been followed-up with serial PCR after cone treatment.

Results: HR-HPV were closely associated with CIN (OR 19.12; 95%CI 2.31-157.81) and SCC (OR 27.25; 95%CI 3.28-226.09). There was a significant linear relationship between the lesion grade and intensity of p16^{INK4a} staining (p=0.0001). The expression of p16^{INK4a} was also closely related to HR-HPV (p=0.0001). p16^{INK4a} staining was a 100% specific indicator of CIN, with 100% PPV, and showed 83.5% sensitivity and 80.1% PPV in detecting HR-HPV. However, p16^{INK4a} staining did not predict clearance or persistence of HR-HPV after treatment of CIN. Importantly, p16^{INK4a} staining was a significant predictor of favourable prognosis in cervical cancer, both in univariate (p=0.006) and multivariate survival analysis (p=0.003). After adjustment for age, HR-HPV, and metastases in the Cox regression model, OR 0.219 (95%CI 0.083-0.580) indicates that positive p16^{INK4a} is highly protective against cancer death. This predictive power is equal to that (p=0.003) of distant metastases, which had a lower adjusted OR 2.98 (95%CI 1.463-6.074), however.

Conclusions: In our multivariate model (missing FIGO stage), the prognostic power of p16^{INK4a} was equal to that of distant metastases. Whether the prognostic value of p16^{INK4a} staining can compete with the known high predictive power of FIGO stage in cervical cancer, remains to be seen in controlled future studies.

P171

VACCINAZIONE ANTI-EPATITE B NEGLI ADOLESCENTI: ESITI DOPO 11 ANNI

A. Gabbuti¹, A. Degli Esposti¹, P.L. Blanc¹, C. Galli², F. Mazzotta¹

¹Malattie Infettive, Ospedale S. Maria Annunziata, Firenze;

²Abbott Divisione Diagnostici, Roma

Lo scopo del nostro lavoro è stato di valutare l'efficacia della vaccinazione e la persistenza di livelli protettivi di anti-HBs in una coorte di adolescenti dell'area fiorentina.

Pazienti e metodi: lo studio è stato condotto su 469 adolescenti (215 maschi e 264 femmine; età media 11,7 ± 0,4 anni) vaccinati nel 1992; un mese dopo il completamento del ciclo vaccinale (3 dosi a T0, T1 e T6) i soggetti sono stati testati per anti-HBs (Ausab EIA, Abbott). Una prima verifica dei titoli di anti-HBs è stata effettuata con lo stesso metodo nel 1999, mentre nel 2003 sono stati valutati sia l'anti-HBs che l'anti-HBc con metodica MEIA (IMx Ausab e Core, Abbott). I valori di anti-HBs sono espressi da entrambi i metodi in mUI/mL, con livelli protettivi ≥10.

Risultati: I valori di anti-HBs nel 1992 erano disponibili per 462 soggetti (98,5%); di questi, 351 (76%) sono stati controllati nel 1999 e 263 (56,9%) nel 2003. Nel 1992 tutti tranne uno presentavano livelli ≥10 di anti-HBs, l'80,2%

aveva livelli superiori a 1.000 mUI/mL e la media era di 4.880 mUI/mL. Dopo 7 anni, il 93,2% dei soggetti era ancora positivo per anti-HBs con titoli protettivi. Dopo 11 anni nessuno dei 262 soggetti controllati era positivo per anti-HBc, mentre il 91,3% era positivo per anti-HBs con valori >10 mUI/mL, e il 16,6% con livelli ≥1.000. Il decremento medio di anti-HBs dopo 11 anni era di 1,41 ± 0,47 log₁₀ 10 mUI/mL, ed era proporzionale ai livelli iniziali.

Conclusioni: in questa coorte di adolescenti la vaccinazione anti-HBV ha mostrato un'efficacia del 100%. Il calo dei livelli di anti-HBs è risultato correlato con il livello di picco rilevato un mese dopo la 3° dose di vaccino. Visti i complementi epidemiologici indotti dalla vaccinazione obbligatoria è necessaria la valutazione degli studi sulla memoria immunitaria per proporre o meno una dose di richiamo nei soggetti con <20 mUI/mL di anti-HBs, che erano il 12% del totale.

P172

DETERMINAZIONE DI HCMV IN PAZIENTI TRAPIANTATI; COMPARAZIONE TRA COBAS CMV MONITOR ROCHE, "IN HOUSE" REAL-TIME PCR E ANTIGENEMIA PP65

Biasiolo M.A., Campion L., Kraniotaki E., Mengoli C., Cusinato R.

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche
 UO Microbiologia e Virologia
 Complesso Convenzionato
 Azienda Ospedaliera-Università Padova

La diagnosi precoce delle infezioni da Cytomegalovirus (CMV) è uno dei principali obiettivi nel monitoraggio dei pazienti trapiantati. La ricerca quantitativa della viremia è uno dei parametri decisionali per l'inizio di terapia specifica ("preemptive therapy") e per il monitoraggio del successo terapeutico. Il metodo maggiormente impiegato è la ricerca dell'Ag pp65 nei leucociti polimorfonucleati del sangue periferico. Recentemente si sono affermati metodi molecolari per la determinazione della carica virale. In tale ambito presentiamo i risultati di uno studio comparativo tra antigenemia pp65 e due metodi molecolari quantitativi, Cobas Amplicor CMV Monitor (Roche) ed "in house" Real-Time PCR.

Sono stati esaminati 154 campioni provenienti da 127 pazienti sottoposti a trapianto di organo solido (cuore, fegato, rene, polmone) e midollo. La determinazione dell'Antigenemia è stata fatta su preparati di 200.000 leucociti, mentre la CMV-DNA è stato quantificato su preparazioni di PBLs, ed il risultato veniva espressa come N° di copie genomiche/10⁶ cellule. L'estrazione degli acidi nucleici è stata eseguita manualmente, secondo protocollo, per Amplicor mentre per la Real-Time PCR si è ricorso ad un sistema automatizzato (stazione robotizzata multiprobe II HT exp. Perkin Elmer Lifescience). In RT-PCR la valutazione dell'idoneità dei campioni è stata confermata coamplificando con CMV-DNA un frammento genico della beta-globina.

Sono risultati positivi 27 campioni all'antigenemia, 38 con Cobas Amplicor e 54 con Real-Time PCR. Rispetto a pp65, Cobas Amplicor e Real-Time PCR hanno dimostrato valori di **concordanza del 92.9% e 82.5%, sensibilità 100% e 100%, specificità 91.3% e 78.7%, PPV 71.1% e 50% e NPV di 100% e 100%** rispettivamente.

I risultati ottenuti dimostrano la validità dei sistemi molecolari quantitativi indagati, soprattutto in termini di sensibilità, se paragonati a pp65. Il loro impiego nella routine diagnostica può risultare utile sia per una diagnosi precoce che nel

monitoraggio della terapia antivirale. Inoltre, l'introduzione dell'automazione nella diagnostica molecolare, specialmente per le fasi di estrazione, consente l'esecuzione di rilevanti carichi di lavoro con abbattimento dei costi.

P173

CMV INFEZIONE: TRAPIANTO ALLO-SCT MIELOABLATIVO VERSUS NON MIELOABLATIVO

Cuzzola M., Iacopino O., Irrera G., Console G., Penna G., Martino M., Melià A., Rigolino C., Morabito F., Iacopino P.

Centro Unico Regionale Trapianti di Midollo Osseo, Azienda Ospedaliera "B-M-M", Via Petrarca 11, 89100 Reggio Calabria

L'infezione da *Cytomegalovirus* (CMV) costituisce una delle maggiori complicazioni nel Trapianto Allogeneico di Cellule Staminali Ematopoietiche (Allo-SCT). Conseguentemente, la precocità della diagnosi ed il monitoraggio della replicazione virale rappresentano punti nodali per la sopravvivenza dei trapiantati. Negli ultimi anni, è aumentato il numero di interventi Allo-SCT non mieloablativi o a ridotta (RI) e minima (MI) intensità di condizionamento, nei pazienti non eleggibili ai trapianti mieloablativi o standard (ST).

Obiettivo. Confrontare l'incidenza della CMV infezione nei trapianti mieloablativi e non.

Pazienti e Metodo. Nel periodo 2000-2003, è stato studiato un gruppo di 78 pazienti sottoposti ad Allo-SCT provenienti da donatori HLA-identici, di cui 8 non familiari (MUD). I pazienti sono stati trattati secondo 3 differenti regimi di condizionamento: ridotta intensità (17 casi), minima intensità (23), ed intensità standard (38 casi, di cui 8 MUD). Dei 78 pazienti, 7 erano affetti da tumori solidi, gli altri da emopatie maligne. Il monitoraggio bisettimanale dell'infezione, si è basato sulla ricerca, mediante immunofluorescenza indiretta, della fosfoproteina strutturale pp65 espressa nei leucociti del sangue periferico e/o midollare, (mAb-p65 CINA pool, clone IC3-AYM; Argene).

Risultati. L'antigene pp65 era positivo in 29 pazienti (37,2%), entro 100 giorni dall'infusione di SC (mediana 52). L'incidenza della CMV-infezione era più elevata nel gruppo Allo-SCT-ST vs RI e MI, (p=.001). In particolare, la positività per pp65 è stata dimostrata nel 100% dei pazienti Allo-SCT-ST MUD e nel 40% dei casi con donatore consanguineo. Per quanto riguarda i pazienti sottoposti a condizionamenti non mieloablativi, solo il 17,6% Allo-SCT-RI e il 20,7% Allo-SCT-MI hanno sviluppato infezione. In tutti i casi, trattati con ganciclovir, il tempo medio per la clearance virale è stata pari a 6 giorni.

Conclusioni. Questo studio suggerisce un minor rischio d'infezione citomegalica nei trapianti non mieloablativi, probabilmente dovuto al protettivo ruolo dalla quota residua dei linfociti T del ricevente.

P174

HCV AXSYM: PREDITTIVITA' RAPPORTO S/CO

Lo Cascio C., Maimeri G., Damiazzì L.

UOA Laboratorio Analisi ULSS20 VERONA

Alla luce delle raccomandazioni CDC, che suggeriscono di interpretare e refertare i risultati dei test HCV EIA mediante il rapporto campione/cut-off (S/CO), abbiamo valutato tale

rapporto utilizzando il kit AxSYM HCV 3.0 Abbott in relazione al risultato dell'immunoblot (IB) (Deciscan HCV PLUS Bio-Rad) e alla determinazione dell'RNA virale (effettuata presso altra struttura).

I dati ottenuti sono mostrati in tabella (non per tutti i campioni è stato possibile eseguire tutte le determinazioni):

HCV		IB			RNA			
n°	S/CO	n°	neg	nd	pos	n°	neg	pos
31	<1					31	31	
96	1-2,4	96	51	45	0	20	20	
68	2,5-10	68	17	37	14	22	22	
12	11-21	10	0	3	7	5	2	3
70	>21*	70	1 †	1 ‡	68			
65	22-70	19	0	0	19	48	13+1	34
78	>70	10	0	0	10	71	3+1	67

* eseguiti su altro strumento AxSYM

† S/CO = 25: non si hanno dati ulteriori sul soggetto

‡ S/CO = 44: non si hanno dati ulteriori sul soggetto

• soggetti con precedenti risultati positivi

In nessuno dei 31 pazienti con negatività di HCV, la ricerca di RNA è risultata positiva.

Per S/CO >21 si ha positività di IB nel 98%, pertanto è adeguata la scelta di tale cut off come limite oltre il quale refertare positivo il test MEIA senza ulteriori approfondimenti.

Per quanto riguarda la positività dell'RNA con S/CO >70 si ha una elevata probabilità di HCV RNA positivo (98% dei casi) mentre per S/CO 21-70 la percentuale di positività è del 72%.

Per S/CO <2.5 non si osserva nessuna positività all'immunoblot e per S/CO <11 nessuna positività dell'RNA.

Per S/CO 11-21 i dati sono pochi e distribuiti equamente tra RNA positivi e negativi, inoltre 2 dei 3 campioni RNA positivi sono IB indeterminati e 1 dei 2 negativi è IB positivo.

Sulla base di questi dati ci sembra pertanto che le procedure di approfondimento diagnostico possano essere, almeno in prima istanza, basate più sul valore del rapporto S/CO che non sulla esecuzione dell'IB.

P175

VALIDAZIONE DI UN PROTOCOLLO DI NESTED PCR SEMIQUANTITATIVA PER LA DETERMINAZIONE CONTEMPORANEA DELLA CARICA VIRALE DEL JCV E BKV

Bergallo M., Merlino C., Sinesi F., Burdino E., Piana F., Negro Ponzì A., Cavallo R.

Dip. Sanità Pubblica e Microbiologia, S.C. Virologia, Università degli Studi di Torino

I poliomavirus umani BK e JC (BKV e JCV) infettano oltre il 60% della popolazione umana. Dopo il superamento dell'infezione primaria, entrambi i virus rimangono latenti nel rene e nei linfociti B. Quasi tutte le patologie attribuibili al BKV ed al JCV si verificano in condizione di immunodepressione. A differenza del JCV che possiede neurotropismo, le patologie BKV-correlate sono fondamentalmente confinate al tratto urinario. I trapiantati renali sono suscettibili all'azione di questi due virus non solo come risultato della loro riattivazione, ma anche perché possono essere veicolati nell'organismo attraverso l'organo trapiantato. In numerosi studi il BKV è stato correlato con la nefrite interstiziale nei portatori di trapianto renale, in cui il trattamento immunodepressivo sembra indurre o almeno permettere la riattivazione del virus. In questi pazienti l'escrezione del virus nelle urine