

zione degli agenti citopatogeni rivelati mediante esame colturale. Nell'ambito dei 5032 campioni clinici analizzati, 134 campioni di feci, 103 urine e 153 liquor sono stati sottoposti anche a ricerca di acido nucleico virale mediante reazione polimerasica a catena (PCR).

#### Risultati

L'esame elettromicroscopico utilizzato come mezzo per la diagnosi rapida, è stato in grado di rivelare, entro poche ore dall'arrivo del campione, la presenza di numerosi virus, agenti di enterite, negli estratti fecali, mettendo in evidenza anche doppie infezioni, come la presenza di poliomavirus nei sedimenti urinari. Nell'ambito della diagnosi convenzionale, l'esame colturale ha evidenziato diversi agenti citopatogeni, molti dei quali identificati attraverso ME; tra gli altri, un bunyavirus da liquor. L'utilizzo concomitante di PCR e di ME per la diagnosi rapida ha dimostrato che la prima è stata in grado di rivelare la presenza di virus, attraverso il rilevamento di acidi nucleici virali, in un numero di campioni significativamente maggiore rispetto alla microscopia elettronica.

#### Considerazioni conclusive

Il confronto tra metodi tradizionali - in particolare microscopia elettronica ed esame colturale - e metodi molecolari quali PCR, rende conto di quanto la scelta fra gli uni e gli altri sia a volte opinabile e di come, in realtà, ognuno di essi fornisca informazioni non sovrapponibili ma complementari al raggiungimento di una esauriente diagnosi di laboratorio.

## P155

### STUDIO EPIDEMIOLOGICO SULL'INFEZIONE CONGENITA DA CMV E LA SORDITÀ NEUROSENSORIALE IN ITALIA

Barbi M., Binda S., Caroppo M.S., Tanzi M.L., Veronesi L., Germinario C., Calvario A., Bozzi A., Mura I., Piana A., Solinas G.

Istituto di Virologia, Università degli Studi di Milano,  
Via Pascal 38, 20133 Milano

L'accertamento dell'impatto dell'infezione congenita da Cytomegalovirus (CMV) come causa di disabilità è indispensabile per valutare l'opportunità di adottare strategie preventive. Per raccogliere dati sulla prevalenza dell'infezione congenita in Italia è stato esaminato un campione di 9002 bambini nati in 4 regioni; per ogni neonato è stata effettuata la ricerca del DNA virale sulla Guthrie card allestita alla nascita (DBS test). Il test in questione è di semplice esecuzione, poco costoso e quindi facilmente applicabile su larga scala. Il peso dell'infezione come causa di handicap è stato indagato attraverso l'accertamento del suo ruolo nell'eziologia della sordità neurosensoriale (SNHL). A questo scopo è stato eseguito un follow up audiologico dei neonati con infezione congenita individuati nell'indagine sopra descritta; inoltre è stata effettuata la diagnosi retrospettiva di infezione congenita, tramite analisi delle Guthrie card, in un campione di bambini con SNHL accertata (3 mesi-5 anni). Tra i neonati arruolati sono stati individuati 16 bambini infetti: la prevalenza dell'infezione congenita da CMV è risultata quindi pari all'1,8%. Sia i bambini sintomatici (2) che quelli asintomatici (14) non hanno mostrato segni di danno audiologico né alla nascita né al follow up (16/16 a 6 mesi; 10/16 a 12 mesi e 2/16 a 18 mesi). Le Guthrie card dei 77 bambini con sordità neurosensoriale accertata (> 40 dBHL) sono state recuperate dal Centro Regionale di Screening e saggiate mediante il DBS test: in 19 casi (25%) è stata diagnosticata un'infezione congenita; i bambini in questione erano affetti da sordità

grave o profonda. Si possono quindi trarre le seguenti conclusioni: 1) la prevalenza dell'infezione congenita da CMV in Italia è più bassa di quella stimata in studi precedenti (3-5%); 2) l'infezione congenita sembra essere un'importante causa di SNHL; 3) il DBS test ha giocato un ruolo chiave sia per lo screening che per l'accertamento retrospettivo d'infezione congenita.

## P156

### CORRELAZIONE TRA CARICA VIRALE ED ESPRESSIONE DEI GENI LITICI DI EBV NEL SANGUE PERIFERICO DI TRAPIANTATI RENALI

Bergallo M., Merlino C., Daniele R., Tarallo S., Margio S., Lapenna A., Negro Ponzì A., Cavallo R.

Dipartimento di Sanità Pubblica e Microbiologia,  
S.C. Virologia, Università di Torino

Nei pazienti trapiantati renali è descritto un aumentato rischio di disordini linfoproliferativi post-trapianto (PTLD) che consistono in un'ampia gamma di manifestazioni patologiche, dall'iperplasia linfoide ai linfomi. E' ormai riconosciuta una forte correlazione tra l'infezione da EBV, il grado ed il tipo di immunosoppressione e l'insorgenza di PTLD. Recentemente, è stata descritta una correlazione tra l'incidenza di PTLD e la quantità di EBV-DNA, misurata mediante PCR quantitativa, nel sangue periferico di questi pazienti. La valutazione della viremia da EBV sembra, quindi, essere un utile indicatore prognostico del rischio di sviluppare una PTLD.

Dal momento che i nostri studi hanno dimostrato, in accordo con quanto riportato in letteratura, che la carica di EBV-DNA nei linfomonociti presenta un andamento fluttuante e che è assente nel siero di trapiantati renali asintomatici, in questo studio abbiamo valutato in parallelo la carica virale e l'espressione dei geni virali litici nel sangue periferico di questi pazienti, allo scopo di evidenziare l'attivazione dell'infezione litica, ulteriore parametro per la valutazione dei pazienti a rischio di PTLD. La carica di EBV-DNA è stata quantificata nei linfomonociti di 46 trapiantati renali (29 maschi, 17 femmine, età media 51,6 +/- 11,5 anni; mediana del tempo dal trapianto 60 mesi; 21 in terapia con FK506 e 25 in ciclosporina A) mediante PCR quantitativa-competitiva messa a punto nel nostro laboratorio, mentre gli RNA messaggeri (mRNA) relativi ai geni litici (BZLF-1; BALF-2; BcLF-1) sono stati determinati mediante nested RT-PCR da noi sviluppata.

## P157

### SVILUPPO DI UNA PCR QUANTITATIVA COMPETITIVA PER LA VALUTAZIONE DELLA CARICA VIRALE DELL'EBV

Bergallo M., Merlino C., Daniele R., Sidoti F., Mantovani S., Negro Ponzì A., Cavallo R.

Dipartimento di Sanità Pubblica e Microbiologia, S.C. Virologia,  
Università di Torino

I disordini linfoproliferativi post-trapianto (PTLD) rappresentano una grave complicanza che può verificarsi nei portatori di trapianto d'organo. E' stata descritta una correlazione tra l'infezione da EBV, il grado ed il tipo di immunosoppressione e l'insorgenza di PTLD. Poiché l'EBV è caratterizzato

dal fenomeno della latenza, la PCR qualitativa risulta di scarsa utilità. L'utilizzo di una PCR quantitativa, invece, permette di valutare l'andamento dell'infezione in riferimento ai livelli basali dei singoli pazienti. Questo lavoro descrive lo sviluppo di un protocollo per la quantificazione dell'EBV-DNA al fine di monitorare l'infezione da EBV. Il protocollo prevede uno screening mediante PCR semi-quantitativa dei campioni contenenti un numero  $\geq 10^3$  genomi virali/ $10^5$  linfomonociti o 100  $\mu$ l di siero, seguito da una quantificazione più precisa della carica virale dei campioni che superano tale soglia, mediante PCR quantitativa-competitiva (QC-PCR). La costruzione del competitore si è basata sulle differenti dimensioni degli ampliconi del wild-type e del competitore (171 bp vs. 247 bp). I risultati ottenuti mostrano che sia il competitore sia il bersaglio vengono amplificati con la stessa efficienza, se coamplificati con la medesima miscela di reazione. Nella PCR semi-quantitativa vengono utilizzate, come standard esterno, quattro diluizioni scalari di pEB171, (50, 1000 copie), ciascuna contenente 50 copie del plasmide pEB-C per calibrare lo standard esterno e per controllare la presenza di eventuali inibitori della Taq polimerasi nei campioni. La QC-PCR si basa sulla coamplificazione del campione con quattro diluizioni del competitore pEB-C (standard interno) contenenti 1.000, 5.000, 10.000, e 50.000 copie, rispettivamente. In conclusione, il protocollo sopra descritto può rivelarsi un valido strumento per valutare l'andamento dell'infezione da EBV nei soggetti portatori di trapianto d'organo allo scopo di individuare le riattivazioni virali e studiarne il ruolo nell'insorgenza dei disordini linfoproliferativi post-trapianto.

## P158

### SORVEGLIANZA DELLE INFEZIONI OSPEDALIERE DA ROTAVIRUS IN UN OSPEDALE PEDIATRICO

\*Portanova A., \*\*Bernaschi P., \*\*Argentieri M., \*\*Menichella D., \*Langiano T.

\*\*U.O. Laboratorio di Microbiologia  
Osp. Pediatrico Bambino Gesù di Roma  
\*C.I.O. Direzione Sanitaria  
Osp. Pediatrico Bambino Gesù di Roma  
Piazza S. Onofrio 4 Roma 00165

**Scopo.** Data l'elevata incidenza delle infezioni virali nosocomiali del tratto gastro-intestinale in età pediatrica, esse rappresentano infatti il 35% di tutte le Infezioni Ospedaliere, abbiamo valutato la frequenza di Infezioni Ospedaliere da Rotavirus in un ospedale pediatrico nell'anno 2003 in tutte le Unità Operative. Viene riportato dalla letteratura che in Pediatria Generale tale frequenza è compresa tra 68,7-76%.

**Materiali e metodi.** Nell'anno considerato sono giunti al nostro laboratorio 644 campioni di feci da Reparti di Degenza. La metodica si basa sulla ricerca diretta dell'antigene. L'età media dei pazienti reclutati nello studio è di 20 mesi. Sono state definite I.O. i campioni positivi ottenuti da pazienti ricoverati da almeno 72 ore.

**Risultati.** Sono risultati positivi, alla ricerca del Rotavirus, 184 campioni (28,6%) di questi 57 (31%) rappresentano Infezioni Nosocomiali mentre le Infezioni comunitarie sono 127 (69%).

Dalla sorveglianza si evidenzia, come già noto, che il maggior numero di infezioni si è verificato durante i mesi invernali.

**Conclusioni.** Le I.O da Rotavirus non differiscono per gravità o per sintomi dalle infezioni acquisite in comunità ma

possono aggravare il quadro clinico di bambini affetti da altre patologie, prolungando ulteriormente il ricovero. Importante per prevenire la diffusione di queste infezioni all'interno delle strutture ospedaliere sono soprattutto l'impiego di accurate misure igieniche. Pertanto dallo studio si evince la necessità di emanare delle raccomandazioni per la prevenzione delle infezioni ospedaliere da Rotavirus, con una formazione mirata nei diversi Reparti di degenza. Dopo la formazione/informazione verrà ripetuto lo studio per verificare se se sono state adottate le raccomandazioni suggerite con conseguente diminuzione delle infezioni nosocomiali.

## P159

### UTILITÀ DIAGNOSTICA DELLA RICERCA DI CEPPI ONCOGENI DI PAPPILLOMA VIRUS NELLA PREVENZIONE DEL CANCRO DELLA CERVICE

Venturi C., Marini P., Apicella P., Bianchi L.

Ospedale di Pescia, "SS Cosma e Damiano", ASL 3 Pistoia, Zona della Val di Nievole, Via Cesare Battisti 2, 51017 Pescia (PT).

Numerose evidenze biologiche ed epidemiologiche indicano come l'infezione persistente della cervice uterina da parte di ceppi HPV ad alto rischio oncogeno (16, 18, 31, 33) si associ alla presenza e sviluppo di lesioni intraepiteliali squamose pre-invasive ed invasive.

**Obiettivi.** Con questo studio abbiamo valutato:

- 1) l'incidenza dell'infezione da HPV in pazienti che presentavano lesioni intraepiteliali al pap-test;
- 2) la correlazione esistente fra ceppi ad alto rischio oncogeno e gravità delle lesioni.

**Metodologia.** In una popolazione di 583 donne di età compresa tra i 15 e gli 81 anni (febbraio 2001-ottobre 2003) che presentavano al pap-test lesioni cervicali intraepiteliali quali ASCUS (anomalie squamose di incerto significato), LSIL (lesioni intraepiteliali squamose di basso grado) e HSIL (lesioni intraepiteliali squamose di alto grado) è stato ricercato l'agente virale HPV da prelievo endocervicale. Le metodiche impiegate sono: 1) per la ricerca, la reazione a catena della polimerasi (PCR) con l'utilizzo di primers specifici della regione L1; 2) per la genotipizzazione, la digestione enzimatica con gli enzimi di restrizione Tru91 e Rsa1 (Diatech).

**Risultati.** L'infezione da HPV è stata riscontrata nel 22% (35/160) di ASCUS, nell'82% di LSIL (116/141) e nel 94% di HSIL (16/17). Gli HPV ad alto rischio rappresentano il 68,6% (24/35) di ASCUS HPV-positivi, il 65,5% (76/116) di LSIL HPV-positivi ed il 94% (15/16) di HSIL HPV-positivi. Al controllo istologico dei 17 HSIL, 1 presentava un carcinoma in situ, 7 una displasia grave, 5 una displasia moderata, 3 una displasia lieve e 1 una leucoparacheratosi.

Tra i ceppi virali a basso rischio il più frequente è risultato l'HPV11 (18,8%) e fra quelli ad alto rischio i più frequenti sono risultati l'HPV16 (23,7%) e l'HPV 31(16,2%).

**Conclusioni.** 1) La rilevanza diagnostica della ricerca e genotipizzazione dell'HPV per selezionare le pazienti a più alto rischio per il carcinoma della cervice uterina permette un più attento monitoraggio e un trattamento più adeguato e efficace; 2) l'incidenza di HPV ad alto rischio oncogeno del 94% nei casi HSIL, in accordo con la recente letteratura internazionale, suggerisce l'utilità della ricerca dell'HPV anche per aumentare l'efficacia dello screening primario.

#### BIBLIOGRAFIA.

1. Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol* 2002 Jan 3:11-6.