

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., Damiazi 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

ha un'incidenza del 5-45% e la replicazione massiva del BKV nell'epitelio tubulare risulta nella perdita dell'organo in circa il 3-5% di essi. Recentemente è stato ipotizzato che nei trapiantati renali alcuni casi di nefropatia possano essere associati al JCV. L'utilità clinica della PCR qualitativa è limitata dal momento che la sola presenza del DNA virale non può essere considerata indice diagnostico. Nel nostro laboratorio abbiamo messo a punto una metodica di nested-PCR semi-quantitativa allo scopo di valutare la carica virale sia del JCV che del BKV in questi pazienti per meglio valutare il ruolo patogenetico di questi due virus nell'insorgenza della nefropatia. Tale metodica si basa sulla valutazione comparativa degli amplificati virali con gli amplificati ottenuti da diluizioni scalari della stessa sequenza bersaglio (standard esterno). L'utilizzo della tecnica nested permette uno screening dei campioni negativi perché nella prima quantificazione si utilizzano primers comuni al BKV e JCV mentre con la seconda amplificazione, effettuata solamente sui campioni positivi, vengono quantificati il JCV e/o il BKV separatamente.

P176

UTILIZZO DI UNA METODICA D'ISOLAMENTO VIRALE RAPIDO NELLA DIAGNOSI D'INFEZIONE DA VIRUS RESPIRATORI.

*De Fina G., °Casini M., ^Zanon P., ¯Coser S., Pescolliderung L., *Lang A. e *Pagani E.

*Servizio Interaziendale di Microbiologia e Virologia,
°Dipartimento di Ematologia, ^Unità di Terapia Intensiva,
¯Divisione di Oculistica, Dipartimento di Pediatria, Ospedale Centrale di Bolzano, Italia.

Lo studio condotto presso il Servizio Interaziendale di Microbiologia e Virologia dell'Ospedale Centrale di Bolzano ha valutato l'impatto dell'utilizzo di una metodica d'isolamento virale rapido (*shell vial*, SV) sulla diagnosi precoce d'infezione sostenuta da sette differenti virus respiratori.

Da ottobre 2003 a febbraio 2004, 15 lavaggi bronco-alveolari, 35 escreati, un tampone oculare e 24 lavaggi naso-faringei (tot=75) sono stati raccolti da pazienti ricoverati presso differenti reparti, con una clinica suggestiva per infezione da virus respiratorio. La presenza ed infettività dell'Adenovirus (Adeno), dei Virus dell'Influenza A e B (Flu A, Flu B), dei Virus Parainfluenzali 1, 2, 3 (Para1, Para2, Para3) e del Virus Respiratorio Sinciziale (RSV) è stata indagata utilizzando metodiche d'immunofluorescenza diretta (DFA), SV e coltura a lungo termine (LT). Le colture virali, sia SV sia LT, sono state allestite utilizzando una combinazione (R-Mix) di due differenti linee cellulari (A549, derivate da adenocarcinoma polmonare umano, e Mv1Lu, ovvero cellule epiteliali polmonari di visone), recentemente descritte per la loro permissività ai virus indagati e maggiore praticità se confrontate con le tradizionali linee cellulari convenzionalmente utilizzate. Per l'identificazione virale è stato in prima istanza utilizzato un *pool* anticorpale in grado di riconoscere simultaneamente gli antigeni dei diversi virus indagati. In caso di positività, i campioni sono stati indagati per la presenza dei singoli virus.

I risultati ottenuti hanno permesso d'identificare 21 ceppi virali (28% di positività), e cioè un Adeno, 3 FluA, un Para1, 3 Para3 e 13 RSV. In particolare la DFA ha consentito di rilevare la presenza virale in 15 casi, mentre la metodica SV e LT hanno permesso l'isolamento in 19, di cui 17 entro le 48 ore, e 6 casi rispettivamente.

Sulla base di tali osservazioni, riteniamo che l'associazione

del sistema SV/R-Mix con DFA sia di estrema utilità nell'ambito della diagnosi precoce d'infezione da virus respiratori.

P177

CONFRONTO TRA METODICHE PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI ANTI HERPES VIRUS DI TIPO 1 E 2 TOTALI E SINGOLI

Di Natale C., Fonio P., Tozzini M., Pellò M.G.

Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Ospedale Maggiore Novara

L'Herpes simplex è un virus incapsulato a DNA morfologicamente simile agli altri membri della famiglia degli Herpetoviridae. Esistono due tipi naturali di HSV che provocano infezioni nell'uomo di gravità variabile da lesioni cutanee lievi ad encefalite. L'HSV di tipo 1 (HSV-1) colpisce generalmente le membrane mucose dell'occhio, la bocca e le giunzioni mucocutanee del viso ed è anche causa di encefalite sporadica grave. L'HSV tipo 2 (HSV-2) è di solito associato a lesioni genitali mucocutanee. Poiché HSV-1 e HSV-2 presentano determinanti antigenici comuni, gli anticorpi diretti contro un tipo di virus possono dare reazioni crociate con l'altro tipo.

Lo scopo di questo lavoro è quello di riuscire a distinguere dopo aver dosato gli anticorpi totali anti HSV 1-2, a livello sierologico, gli anticorpi diretti verso HSV-1 da quelli diretti verso HSV-2 utilizzando test per la determinazione quantitativa di anticorpi specifici di classe IgG. I suddetti test impiegano la tecnologia della chemiluminescenza (CLIA). Per questi saggi sono stati utilizzati sieri di donne in gravidanza durante i loro normali controlli trimestrali e di pazienti ricoverati presso i reparti di medicina e di neurologia dell'Azienda Maggiore della Carità di Novara

P178

PREVALENZA DI SOTTOTIPI NON-B DI HIV-1 IN CAMPANIA

Di Nicuolo G.¹, Starace M.¹, Battisti S.¹, Pizzella T.⁴, Busto A.³, Glielmi G.², Battaglia M.¹.

¹Servizio di Virologia,

²3° Divisione di Malattie Infettive,

³4° Divisione di Malattie Infettive,

⁴8° Divisione di Malattie Infettive, A. O. "D. Cotugno", Napoli

Obiettivo Valutare la prevalenza dei sottotipi non-B di HIV-1 mediante analisi filogenetica del gene *pol* in soggetti con infezione da HIV-1 residenti nella regione Campania.

Materiali e metodi Sono stati inclusi nello studio 234 soggetti di nazionalità italiana, residenti nella regione Campania, sottoposti a sequenziamento del gene *pol* di HIV-1 per la determinazione della resistenza alla terapia antiretrovirale. È stata effettuata la sequenza dell'intero gene delle proteasi e dei codoni 1-335 del gene della trascrittasi inversa mediante kit ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System (Abbott Laboratories) secondo le procedure raccomandate. Il sequenziamento del prodotto amplificato è stato effettuato mediante elettroforesi in gel di poliacrilamide con ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystem). L'analisi delle sequenze è stata effettuata con DNA Sequencing Analysis software, version 3.4 e ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System software, version 2.5 (Applied Biosystem). Le sequenze otte-