

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.<sup>1</sup>, Starace M.<sup>1</sup>, Battisti S.<sup>1</sup>, Pizzella T.<sup>4</sup>, Busto A.<sup>3</sup>, Glielmi G.<sup>2</sup>, Battaglia M.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Servizio di Virologia,

<sup>2</sup>3° Divisione di Malattie Infettive,

<sup>3</sup>4° Divisione di Malattie Infettive,

<sup>4</sup>8° 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-

nute sono state sottoposte a saggio interpretativo di predittività di farmacoresistenza e ad analisi filogenetica del sottotipo mediante programma Stanford (<http://hivdb.stanford.edu>). **Risultati** L'analisi filogenetica effettuata sulla sequenza del gene *pol* di HIV-1 ha rivelato la presenza del sottotipo B in 219/234 (3,58%) e di sottotipi non-B in 15/234 (6,41%). I sottotipi non-B erano rappresentati da CRF02\_AG 3 (1,28%), A 2 (0,85%), CRF01\_AE 1 (0,42%), C 1 (0,42%), D 1 (0,42%), G 1 (0,42%) e dai sottotipi misti D (PR) / B (RT) 2 (0,85%), G (PR) / B (RT) 1 (0,42%), A (PR) / CRF01\_AE 1 (0,42%), CRF02\_AG (PR) / A (RT) 1 (0,42%), CRF01\_AE (PR) / A (RT) 1 (0,42%). L'analisi filogenetica effettuata sulla sola sequenza del gene della trascrittasi inversa ha mostrato la presenza di sottotipi non-B 12/234 soggetti (5,12%): CRF02\_AG 4 (1,70%), A 3 (1,28%), CRF01\_AE 2 (0,85%), C 1 (0,42%), D 1 (0,42%), G 1 (0,42%).

La distribuzione dei sottotipi non-B nei soggetti con sieropositività per HIV-1 rilevata in epoca antecedente al 1999 è risultata del 2,84%, mentre nei soggetti con sieropositività rilevata negli ultimi cinque anni è risultata del 10,42%.

**Conclusioni** Questo studio mostra una bassa prevalenza dei sottotipi non-B in soggetti con infezione da HIV-1 nella popolazione autoctona della regione Campania, ma un significativo incremento nella prevalenza dei sottotipi non-B negli ultimi anni.

## P179

### CONFRONTO TRA SISTEMI IN AUTOMAZIONE. HIV-Ag/Ab-COMBO AxSYM (ABBOTT) VERSO ANTI-HIV-VITROS (ORTHO).

Marinelli M., Tomassini L., Soldini L., Dorigatti F.

*Diagnostica e Ricerca S. Raffaele, Via Stamira d'Ancona 20, Milano.*

**Obiettivo** In questi anni diverse sono state le proposte delle Società Diagnostiche di sistemi per una migliore e precoce diagnosi di infezione da HIV. Nel nostro Istituto abbiamo valutato un test automatizzato che rileva contemporaneamente sia gli anticorpi che l'antigene p24 di HIV (AxSYM HIV Ag/Ab Combo Abbott), confrontandolo con la metodica da noi in uso (Vitros-Anti-HIV Ortho).

**Metodologia** Lo studio è stato effettuato mediante: a) comparazione di 520 campioni non selezionati; i campioni reattivi e/o discordanti sono stati analizzati ulteriormente con test di conferma western blot HIV-1/2 (Genelabs); b) analisi con AxSYM di 39 campioni con positività nota al test HIV-RNA; c) misurazione con AxSYM e Vitros del pannello commerciale PBR-108 BBI per 4 sessioni in giorni diversi; d) verifica per AxSYM della stabilità, nel tempo, della calibrazione con l'utilizzo di 4 controlli (un negativo e tre positivi).

**Risultati** Dei 520 campioni analizzati 519 sono risultati concordanti (511 non reattivi, 8 reattivi) e 1 discordante (test Chi quadro non significativo, concordanza tra metodi 99,8%, sensibilità e specificità di AxSYM verso Vitros 88,9% e 100% rispettivamente). La sensibilità nel gruppo dei 39 soggetti reattivi a diverse concentrazioni al test HIV-RNA è stata del 100%. La riproducibilità dei risultati è stata inferiore a 7% intrasaggio e 11% intersaggio. I 15 campioni del pannello sono stati classificati correttamente e con buona ripetibilità da entrambi i metodi con C.V. medio per AxSYM di 5,8% e per Vitros di 2,3%. L'analisi statistica della distribuzione dei risultati negativi ha evidenziato una deriva verso i valori positivi più per Vitros che per AxSYM; i coefficienti di Asimmetria e di Curtosi sono positivi e il rapporto deviazione standard su coefficiente è significativo.

**Conclusioni** Il test Vitros, al contrario di AxSYM, per mini-

me variazioni di anticorpo presente ha un'ampia variazione di segnale e migliora così la sensibilità del metodo pur, probabilmente, perdendo in specificità (il campione discordante era negativo al WB). Il test AxSYM, al contrario, cerca di migliorare la sensibilità del test con la contemporanea misurazione dell'antigene e degli anticorpi al fine di individuare precocemente l'avvenuta infezione senza perdere in specificità. In conclusione: il test AxSYM-Anti-HIV-Combo ha evidenziato caratteristiche analitiche confrontabili con il metodo in uso in routine e potrebbe, anche se non abbiamo potuto verificarlo in questo studio, rivelarsi vantaggioso nella rilevazione precoce dell'infezione HIV.

## P180

### MONITORAGGIO DELL'INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS NEI PAZIENTI TRAPIANTATI D'ORGANO E DI MIDOLLO: CONFRONTO TRA L'ANTIGENEMIA E LA PCR REAL TIME.

Sassi M., Gabrielli L., Bellucci T., Lionetti G., Monari P., Lazzarotto T., Landini M.P.

*U.O di Microbiologia, Laboratorio di Virologia, Policlinico S.Orsola-Malpighi, Università degli Studi di Bologna, Bologna.*

L'infezione da Citomegalovirus (CMV) rappresenta una seria minaccia per il buon esito del trapianto e per la stessa sopravvivenza del soggetto trapiantato. Il controllo della fase ematica dell'infezione citomegalica è utile per predire l'eventuale progressione verso la malattia e per monitorare l'efficacia della terapia antivirale.

In questo studio abbiamo valutato un nuovo sistema di PCR Real-Time per quantificare il genoma di CMV in campioni di leucociti polimorfonucleati (PMNL) provenienti da pazienti trapiantati d'organo e di midollo osseo.

Sono stati presi in considerazione 273 campioni di sangue periferico provenienti da 11 trapiantati di cuore, 8 di fegato e 5 di midollo. La ricerca quantitativa del DNA di CMV è stata condotta utilizzando un saggio di PCR Real Time (Q-CMV Real Time System - AMPLIMEDICAL). Le procedure di estrazione e amplificazione sono state eseguite come indicato nelle istruzioni operative del kit. I risultati sono stati espressi come n.copie/10<sup>5</sup> PMNL.

Gli stessi campioni sono stati sottoposti al test dell'antigenemia, test utilizzato di routine nel nostro laboratorio.

Per la ricerca quantitativa del DNA di CMV nel sangue il sistema Real Time ha mostrato un'ottima sensibilità e specificità, in particolare:

- sia l'antigenemia che la PCR Real Time hanno ritrovato tutti i casi di malattia, con un valore di mediana di 0 giorni (antigenemia) e 18.5 giorni (Real Time) rispetto all'inizio dei sintomi.

- il trattamento antivirale determina a livello ematico un marcato decremento (>90%) o scomparsa del DNA di CMV.

- il possibile valore soglia proposto per l'inizio della terapia pre-emptive potrebbe essere di 3500-4000 copie/10<sup>5</sup> PMNL.