

P196**STUDI FILOGENETICI DI ADENOVIRUS CIRCOLANTI IN ITALIA E LORO IDENTIFICAZIONE IN CAMPIONI D'ACQUA ARTIFICIALMENTE CONTAMINATA.**Muscillo¹ M.; La Rosa¹ G.; De Carolis¹ E.; Sali¹ M.; Manzara² S. e G. Fadda².¹Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Ambiente e Prevenzione Primaria, Viale Regina Elena 299, 00161 Roma.²Università Cattolica Sacro Cuore Istituto di Microbiologia, Largo F.Vito 1, 00168 Roma.

Gli adenovirus sono un gruppo estremamente eterogeneo e diffuso di virus che provocano malattie prevalentemente a carico dell'apparato respiratorio sia nell'uomo che negli animali. Sono noti due generi: i mastadenovirus, con 9 gruppi che infettano l'uomo ed altri mammiferi e gli aviadenovirus con 5 gruppi che infettano gli uccelli, per un totale di 120 differenti virus di cui 47 sierotipi isolati dall'uomo. Sono trasmessi attraverso vie oro-fecali piuttosto che respiratorie. Hanno dipendenza stagionale e colpiscono bambini in età scolare durante il periodo estivo ed i militari di leva nel periodo invernale con febbri faringo-congiuntivali. Non vi sono dati recenti sui sierotipi circolanti in Italia né si hanno dati sulla loro presenza nell'acqua destinata alla balneazione. Questi dati sono essenziali per la revisione, in sede comunitaria, delle normative riguardanti i parametri virologici delle acque di balneazione. Ceppi di adenovirus, isolati su cellule Hep2 infettate con tamponi faringei o fecali provenienti da pazienti afferenti al Policlinico A. Gemelli di Roma, sono stati tipizzati mediante metodi sierologici. Successivamente il DNA estratto dai lisati cellulari, è stato analizzato mediante PCR in diverse regioni dell'esone. Gli ampliconi, da 300 a 680 bp, sono stati purificati e sequenziati su sequenziatore a capillare ABI310. Come controlli positivi sono stati utilizzati ceppi di adenovirus 40 e 41 dell'ATCC. Tra i ceppi esaminati, l'adenovirus 1 e 2 sono risultati tra i più frequenti.

L'identificazione degli adenovirus mediante PCR è risultata possibile anche quando è stato esaminato un campione di 100 µl proveniente dalla originaria contaminazione di 10 L di acqua distillata prima infettati con 10^2 - 10^5 TCID₅₀ di adenovirus 40 e poi sottoposti a concentrazione su membrana a flusso tangenziale. La presente metodologia può avere applicazioni utili in campo epidemiologico, clinico ed ambientale.

P197**IL RUOLO EMERGENTE DEL VIRUS TOSCANA NELL'Eziologia delle Meningiti estive nelle Marche**Pauri P.^{1,2}, Marinelli K.¹, Balercia M.¹, Tomassini T.¹¹UO Virologia, AO Ospedali Riuniti, Ancona;²Gruppo di Lavoro AMCLI CoSV "Infezioni virali del Sistema Nervoso Centrale"

Scopi: Scopo del presente lavoro è stato quello di esaminare i dati raccolti nel quinquennio 1999-2003 per descrivere la circolazione ed il peso del virus Toscana nelle Marche in 665 casi di meningiti asettiche estive ricoverate in ospedali della regione, sottoposti anche alla ricerca eziologica per un pan-

nello di virus neurotropi (HSV 1-2, VZ, Morbillo, Parotite, Enterovirus), eventualmente esteso, dopo contatti con i Clinici, ad altri agenti (CMV, EBV, Adenovirus, HHV6) per un totale di 1058 campioni esaminati. In particolare è stato indagato il ruolo della ricerca di IgG e IgM anti virus Toscana rispetto alla ricerca dell'RNA su liquor c.s.

E' già stato ampiamente dimostrato che una diagnosi eziologica rapida delle patologie acute da virus neurotropi è estremamente vantaggiosa sia per la gestione e per la prognosi del singolo paziente, sia dal punto di vista dei costi-benefici, in quanto la diagnosi di infezione da virus Toscana permette di dimettere prima il paziente, evitando il ricorso ad una serie di esami costosi e riducendo l'uso di antibiotici non necessari.

Risultati: Lo studio effettuato dimostra un pesante ruolo del virus Toscana nella eziologia delle meningiti estive a liquor limpido nelle Marche, ruolo che risulta in aumento nel corso degli anni, a partire da un 28% nel 1999 fino al 53,7% del totale dei casi nel 2003. I casi con compromissione encefalica rappresentano il 6%.

Per quanto riguarda la distribuzione dei casi nei diversi mesi estivi si osserva la massima incidenza nei mesi di luglio e agosto, ma anche una deriva dei casi nei mesi di settembre e ottobre.

La presenza di IgM sieriche ha permesso la diagnosi nel 98% dei casi, la presenza di IgM liquorali nel 97,5% e la presenza di RNA virale nel 100%, a conferma del fatto che la ricerca di RNA su liquor è un marker precoce ed affidabile.

Conclusioni: La costruzione con i colleghi infettivologi del nostro Dipartimento di Malattie Infettive e Microbiologia di un Profilo di assistenza per la gestione del paziente affetto da meningite o meningo-encefalite, orientata ai criteri della Medicina basata sulle Evidenze, ha permesso di migliorare la resa della diagnosi eziologica su liquor, che viene raccolto al momento del ricovero.

P198**MONITORAGGIO DI INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS (CMV) NEL PAZIENTE SOTTOPOSTO A TRAPIANTO DI INTESTINO**Nardini G.¹, Merighi A.², Nanni N.¹, Govi V.¹, Bartoletti A.¹, Calvo C.¹, Gennari W.¹, Tamassia G.¹, Pietrosevoli P.¹, Sabbatini A.M.T.¹, Pecorari M.¹.¹Laboratorio di Virologia, Dipartimento Integrato dei Servizi e di Laboratorio, Policlinico, Modena.²Gastroenterologia, Dipartimento Integrato di Medicina e Specialità Mediche, Policlinico, Modena.

Nei pazienti trapiantati di intestino/multiviscerale l'infezione da CMV rappresenta una delle complicanze infettivologiche maggiori risultando spesso responsabile di fenomeni di rigetto.

Scopo della ricerca: allo scopo di stabilire il rapporto tra infezione da CMV e rigetto d'organo, 6 pazienti sieropositivi per CMV, trapiantati di intestino presso il Centro Trapianti di Fegato e Multiviscerale del Policlinico di Modena, sono stati monitorati per riattivazione del virus.

Materiali e metodi: polimorfonucleati di sangue periferico sono stati analizzati per la presenza di CMV mediante ricerca dell'antigene pp65 (antigenemia). Genomi di CMV sono stati ricercati e quantificati, tramite Real Time PCR, in campioni di biopsie intestinali.

Risultati e discussione: su 20 episodi complessivi di rigetto, due, **a** e **b**, osservati in due diversi pazienti, presentavano marker positivi per CMV. Nel caso **a**, copie di CMV DNA erano presenti in elevato numero nella biopsia intestinale

mentre l'antigenemia risultava positiva per un basso numero di nuclei. Nell'episodio di rigetto **b** venivano riscontrati alti valori di antigenemia con basso numero di copie di CMV DNA nelle corrispondenti biopsie intestinali nei primi 6 giorni mentre nei 10 giorni successivi si osservava una inversione dei risultati: ad una antigenemia negativa corrispondevano valori elevati di virus nelle biopsie intestinali.

Una situazione virologica simile a quella associata al caso di rigetto **a** veniva osservata in due pazienti in assenza di manifestazione clinica.

Il fatto che gli stessi risultati virologici del caso di rigetto **a** si siano osservati anche in assenza di eventi clinici, suggerisce che la situazione virologica caratterizzata da: alto numero di copie di CMV DNA nelle biopsie e bassi o negativi valori di antigenemia non correla necessariamente con una situazione di rigetto diversamente da ciò che sembra avvenire quando vengano riscontrati alti valori di antigenemia come nel caso **b**.

In **conclusione**, ai fini del rigetto d'organo, i soli alti valori di CMV a livello intestinale appaiono meno predittivi rispetto ai soli alti valori di antigenemia essendo i primi, verosimilmente, conseguenti alla viremia da riattivazione di CMV a livello ematico.

P199

LA MICROSCOPIA ELETTRONICA QUALE UTILE SUPPORTO PER LA DIAGNOSI DI INFEZIONE DA VIRUS ENTERICI

Pinardi F., Arcangeletti M.C., De Conto F., Medici M.C., Valcavi P., Casula F., Ferraglia F., Motta F., Covan S., Calderaro A., Chezzi C., Dettori G.

Sezione di Microbiologia - Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio. Università degli Studi di Parma.
Viale A. Gramsci, 14. 43100 Parma

Obiettivi

Questo studio si è prefisso di mettere in luce i vantaggi derivanti da un uso mirato della microscopia elettronica nell'ambito della diagnosi di infezione/malattia da virus, in particolare da virus enterici.

Materiali e Metodi

Le indagini virologiche condotte presso l'Unità di Virologia (Sezione di Microbiologia) di Parma, si riferiscono a 3490 campioni di feci, analizzati in un arco di tempo di circa 5 anni, dal gennaio 1999 al gennaio 2004.

L'indagine elettromicroscopica è stata impiegata quale metodo rapido direttamente sugli estratti fecali che, parallelamente, sono stati inoculati in colture cellulari per mettere in evidenza la presenza di agente/i citopatogeno/i.

Gli estratti cellulari positivi (324) sono stati osservati al microscopio elettronico per l'identificazione definitiva del virus in causa.

Risultati

La microscopia elettronica applicata direttamente agli estratti fecali si è dimostrata uno strumento vantaggioso nello svelare, entro poche ore dall'arrivo del campione, la presenza di agenti virali, in particolare quelli difficilmente coltivabili, quali rotavirus, come anche la contemporanea presenza di due virus appartenenti a famiglie generi diversi.

D'altra parte, l'uso congiunto dell'esame colturale e la successiva identificazione dell'agente citopatogeno mediante microscopia elettronica, ha permesso di rivelare la presenza di virus, quali picornavirus, che possono sfuggire all'indagine eseguita sull'estratto fecale sia per la loro scarsa definizione strutturale che per concentrazione insufficiente.

Considerazioni conclusive

Sebbene l'esame elettromicroscopico non rappresenti sempre il metodo di scelta per la diagnosi di infezione da virus, la rapidità di ottenimento dei risultati e la possibilità di visualizzare l'agente (gli agenti) virale/i in causa, lo rendono uno strumento indispensabile in tutte quelle situazioni in cui la tempestività e la sinergia di interventi da parte del microbiologo e del clinico possono essere determinanti nel prevenire la diffusione di un'epidemia, o quando altri metodi convenzionali si mostrino inefficaci nello svelare l'agente virale in causa.

P200

CONFRONTO FRA PCR SEMIQUANTITATIVA E REAL-TIME PCR PER LA DETERMINAZIONE DI CMV-DNA SU PLASMA.

Gregori G., Milia M.G., Faraoni S., Simoncelli B., Di Garbo A., Pistono P.G., Bossi V., Martorana M., Allegramente L., Piro F.

Laboratorio di Virologia,
Ospedale di Malattie Infettive "Amedeo di Savoia", ASL 3, Torino.

Il CMV è causa di morbilità e mortalità nei soggetti HIV positivi.

La terapia HAART ha ridotto notevolmente l'incidenza della malattia da CMV e nei casi di malattia il decorso è più favorevole. Tuttavia nei soggetti in HAART, con conta di CD4+ >200, si segnalano casi di malattia da CMV nei primi mesi di terapia (CD4+ <200 prima della terapia HAART).

Il controllo della fase ematica dell'infezione, con i test dell'antigenemia pp65 e di PCR, permette la diagnosi e il monitoraggio della malattia da CMV.

La quantizzazione del DNA-CMV su plasma nei pazienti HIV positivi correla con la pp65, ha un buon valore predittivo positivo, ma è meno sensibile del DNA CMV da PBMC, che necessita la valutazione di un cut-off correlabile con il manifestarsi della patologia (Piro F. et al. 2000).

In questo studio si sono messi a confronto due diversi metodi d'indagine quantitativa di CMV DNA su plasma: la PCR all'Amplicor Monitor CMV (Roche Diagnostics), già in uso presso il nostro centro, con la Real time PCR (Amplimedical) di nuova introduzione, prendendo in considerazione parametri quali sensibilità e riproducibilità.

I risultati ottenuti sono stati anche comparati a test convenzionali quali la ricerca dell'antigene pp65 nei polimorfonucleati.

Si tratta di uno studio retrospettivo nel quale sono stati selezionati 40 campioni di plasma, di cui 23 risultati positivi all'Amplicor Monitor CMV, raccolti presso il nostro centro a partire da Gennaio fino a tutto Dicembre 2003.

La Real time PCR si è rivelata molto sensibile e ripetibile. I livelli viremici ottenuti (n° genomi/ml) con le due metodiche non sono comparabili; le viremie ottenute con la Real time PCR sono circa 9 volte maggiori rispetto a quelle ottenute con all'Amplicor Monitor CMV.

I risultati, in corso di elaborazione, saranno riportati in dettaglio nel poster.