

**G020****DETERMINAZIONE DELLA VIREMIA E VIRURIA DEI POLIOMAVIRUS BK E JC MEDIANTE DUPLEX-NESTED PCR IN TRAPIANTATI RENALI**

Bergallo M., Merlino C., Sinesi F., Daniele R., Granero V., Giacchino F., Segoloni G.P., Cavallo R.

*Dip. Sanità Pubblica e Microbiologia, S.C. D.U. Virologia, Università di Torino*

*\*S.C. Nefrologia e Dialisi, Ospedale Civile, Ivrea (Torino)*

*\*\*Dip. Medicina Interna, Unità Trapianto Renale, Università di Torino*

Le infezioni da poliomavirus BK e JC (BKV e JCV) nei portatori di trapianto renale si verificano indipendentemente, ma possono anche verificarsi infezioni concomitanti e persistenza contemporanea di entrambi i virus. Questi soggetti sono suscettibili all'azione di entrambi i virus non solo come risultato della loro riattivazione, ma anche perché possono essere introdotti 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. Recentemente è stato ipotizzato che nei trapiantati renali alcuni casi di nefropatia possano essere associati al JCV. Nel presente lavoro abbiamo studiato l'infezione da BKV e/o JCV, valutando la presenza del BKV- e JCV-DNA nei campioni di urina e di siero ottenuti da 51 trapiantati renali e da 29 controlli sani, mediante una duplex-nested PCR messa a punto nel nostro laboratorio. L'escrezione urinaria del BKV-DNA (49%) nei soggetti immunodepressi è risultata in accordo con i dati della letteratura. L'incidenza della viremia da BKV è risultata marcatamente inferiore rispetto alla viruria (23,5% vs. 49%). L'incidenza della viruria da JCV è risultata nettamente inferiore rispetto a quella da BKV (15,7% vs. 49%) mentre l'incidenza della viremia da JCV è risultata relativamente alta (11,8%). Per quanto riguarda il rapporto tra il tipo di trattamento immunodepressivo (tacrolimus vs. ciclosporina A) e l'attivazione dell'infezione da BKV e/o JCV, il nostro studio non ha evidenziato correlazione, dal momento che è stata trovata una percentuale di attivazione (presenza di BKV e/o JCV viremia e/o viruria) simile nei due gruppi di terapia per entrambe le infezioni. I nostri risultati, inoltre, non indicano una correlazione tra l'infezione attiva da BKV e/o JCV e una diminuzione della funzionalità renale.

**G021****FOLLOW UP DELLA CARICA VIRALE DELL'EBV NEI LINFOMONOCITI DI TRAPIANTATI RENALI MEDIANTE UN PROTOCOLLO DI PCR QUANTITATIVA**

Bergallo M., Merlino C., Fumagalli M., Tarallo S., Scutera S., Giacchino F., Negro Ponzi A., Cavallo R.

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

*\*Dip. di Nefro-Urologia, U.O.A. Nefrologia e Dialisi, Ospedale Civile, Ivrea (Torino)*

Nei portatori di trapianto renale è riportato un aumentato rischio di disordini linfoproliferativi (PTLD) che consistono in un ampio spettro di manifestazioni, dall'iperplasia linfoi-

de ai linfomi. È stata descritta un forte correlazione tra l'infezione da EBV, il grado di immunodepressione e l'insorgenza di PTLD; in particolare, il rischio è influenzato dallo stato sierologico per l'EBV del ricevente al momento del trapianto. Recentemente, è stata descritta una correlazione tra l'incidenza della PTLD e la quantità di EBV-DNA nel plasma e nei linfomonociti circolanti, misurata mediante PCR quantitativa. La valutazione della carica virale nel sangue periferico sembra perciò essere un utile indicatore prognostico del rischio di PTLD. Questo lavoro riporta i risultati ottenuti nel monitoraggio mensile, per 6 mesi, della carica virale dell'EBV in 15 trapiantati renali. Il numero delle copie di EBV-DNA è stato valutato nei linfomonociti, mediante una PCR messa a punto nel nostro laboratorio. Otto pazienti erano in trattamento immunodepressivo con tacrolimus (FK506), 7 in ciclosporina A (CyA). Al trapianto, 14 pazienti erano EBV sieropositivi, mentre 1 era sieronegativo. Per tutta la durata dello studio nessun paziente ha sviluppato PTLD. Durante il periodo di osservazione, in 4/14 (28,6%) dei pazienti sieropositivi il numero delle copie genomiche è rimasto inferiore o uguale a 100; in 4/14 (28,6%) ha raggiunto il valore di 500 almeno una volta durante lo studio, in 5/14 (35,7%) ha raggiunto il valore di 1000, e solo in 1/14 (7,1%) ha raggiunto il valore di 5000. Il paziente EBV sieronegativo ha sempre presentato un numero di genomi virali inferiore alla soglia di sensibilità. Per quanto riguarda la relazione tra il tipo di terapia immunodepressiva e la carica virale, 4/6 (66,7%) dei pazienti che ha presentato valori maggiori o uguali alle 1000 copie genomiche, erano in trattamento con FK506 mentre solamente 2/6 (33,3%) erano in trattamento con CyA.

**G022****RICERCA DEL DNA DI HPV IN DONNE CON VIN O CARCINOMA SQUAMOSO DELLA VULVA**

Bonvicini F., Ambretti S., Cricca M., Venturoli S., Gentilomi G., \*Paterini P., \*Santini D., \*Ceccarelli C., Zerbini M., Musiani M.

*Dip. di Medicina Clinica, Specialistica e Sperimentale, Sez. di Microbiologia, e \*Dip. Clinico di Scienze Radiologiche e Istocitopatologiche, Università di Bologna, Via Massarenti 9, 40138 Bologna*

Il carcinoma della vulva rappresenta il 5% dei tumori maligni genitali femminili: considerando l'incidenza dei tumori in questa regione, circa il 90% delle neoplasie è costituita da carcinomi squamocellulari, mentre più raramente essa è sede d'insorgenza di altri tipi di neoplasia.

I carcinomi squamosi della vulva sono distinguibili in due gruppi con eziologia e distribuzione che variano a seconda delle fasce d'età: i carcinomi cheratinizzanti sono tipici della donna anziana (70 anni), sono associati a lesioni di tipo distrofico e sembrano originare da neoplasie intraepiteliali (VIN) di tipo differenziato. I carcinomi basaloidei e bowenoidi sono tipici della donna giovane (età media: 55 anni), possono svilupparsi da VIN indifferenziati, e sono frequentemente associati alla presenza di DNA di papillomavirus umani (HPV).

Nel nostro studio abbiamo ricercato con tecniche di PCR-ELISA e ibridazione in situ il DNA di HPV ad alto rischio oncogeno in 17 biopsie di carcinomi squamosi vulvari (basaloidei, bowenoidi, cheratinizzanti) e 28 VIN (I, II, III di tipo differenziato ed indifferenziato) per stabilire la diversa eziologia dei carcinomi squamocellulari della donna giovane e della donna anziana. Dei 21 VIN indifferenziati

(basaloidi/bowenoidi), 10 sono risultati positivi al DNA di HPV con una netta prevalenza del genotipo 16 (9/10). Il carcinoma squamocellulare infiltrante bowenoide è risultato positivo al DNA di HPV 35. I 7 VIN di tipo differenziato e i 16 carcinomi infiltranti cheratinizzanti sono risultati negativi.

I nostri dati quindi confermano la stretta associazione tra infezione da HPV ed alcuni tipi istologici di carcinomi squamosi e VIN indifferenziati riscontrabili nella donna giovane. Inoltre l'assenza di DNA di HPV nei VIN differenziati e nei carcinomi infiltranti cheratinizzanti della donna anziana supportano la diversa eziologia dei carcinomi della vulva: eziologia virale HPV correlata per i carcinomi squamosi basaloidi e bowenoidi ed eziologia non virale per i carcinomi cheratinizzanti.

**G023**

**VALUTAZIONE ANALITICA DI UN SAGGIO DI REAL TIME PCR PER IL MONITORAGGIO DELL'INFEZIONE DA VIRUS DI EPSTEIN BARR**

Bortolin M.T., Tedeschi R., Zanussi S., Pratesi C., Bidoli E.\*, De Paoli P.

*U.O. di Microbiologia, Immunologia e Virologia e \*Epidemiologia, Centro di Riferimento Oncologico, Istituto Nazionale Tumori-IRCCS, via Pedemontana Occidentale, 12, 33081 Aviano (Pordenone)*

**Introduzione e scopo.** La valutazione quantitativa della viremia EBV è utile per monitorare pazienti a rischio di riattivazione virale. Scopo dello studio è stato approfondire la performance analitica di un saggio Real Time PCR per il dosaggio di EBV e confrontare tale metodo con uno non cinetico.

**Materiali e metodi.** Il sistema Real Time PCR (ABI PRISM 7900-Applied Biosystem) utilizza una sonda TaqMan che amplifica un frammento di 65 pb del gene LMP-1. La curva standard è stata costruita su diluizioni seriali di DNA di cellule Namalwa (range: 4 x 10<sup>3</sup>-4 x 10<sup>6</sup> copie EBV/ml). Campioni corrispondenti a 2.5-5-10 copie in 8 repliche e campioni nel range 2.5-2 x 10<sup>6</sup> copie in 6 repliche sono stati utilizzati per valutare rispettivamente sensibilità e riproducibilità. Sono stati poi dosati 5 campioni di pazienti con mononucleosi infettiva e 2 di carcinoma indifferenziato del nasofaringe, precedentemente dosati con un metodo non cinetico di PCR (Pratesi et al., J Clin Virol, in press).

**Risultati.** La sensibilità è stata del 100% a 10 copie, dell'83% a 5 copie e del 67% a 2.5 copie. I risultati sulla riproducibilità sono stati riportati in tabella:

Copie EBV	Riproducibilità			
	Intra-assay		Interassay	
	% CV	Media	% CV	Media
2.5	37.6	6.9	*	*
5	60.7	13.2	69.4	9.6
20	40.9	26.9	60.6	22.7
200	6.2	188.2	14.1	176.6
2000	7.1	1939.3	1.3	2119.7
20000	0.1	25363.6	0.7	24398.1
200000	5.2	246163.3	2.4	226534.9
2000000	5.6	2583915.0	8.7	2415883.0

Correlazione di Spearman (p<0.01)

Valori di viremia più elevati (1173-46328 copie/ml) sono stati riscontrati rispetto al dosaggio precedente (450-5000 copie EBV/ml).

**Conclusioni.** La metodica Real Time PCR è molto sensibile, riproducibile e consente di processare numerosi campioni in tempi contenuti e con minore laboriosità rispetto alla PCR ordinaria. Queste caratteristiche analitiche e l'eliminazione delle procedure post-PCR, la rendono di facile applicazione e supportano la sua utilità nella valutazione del carico virale per monitorare pazienti che sono a rischio di riattivazione di EBV.

**G024**

**CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICA DI HIV-1 ISOLATO DURANTE UN'INFEZIONE PRIMARIA ASSOCIATA AD UNA SINDROME EMOFAGOCITICA SEVERA**

Castilletti C., Capobianchi M.R.\*, Carletti F., Calcaterra, S., Preziosi R#, Bernardini G#, Perno C.F., Armignacco O#.

*Istituto Nazionale per le Malattie Infettive "L. Spallanzani", Roma #Divisione Malattie Infettive, Ospedale Generale Belcolle, Viterbo*

L'infezione primaria sintomatica da HIV è accompagnata da una più rapida progressione clinica della malattia rispetto all'infezione asintomatica.

Abbiamo voluto caratterizzare biologicamente un isolato virale proveniente da un soggetto con una sindrome emofagocitica severa in infezione primaria da HIV-1, comparando le proprietà del virus trasmesso con quelle del virus del donatore.

L'esame obiettivo di un ventisettenne, ricoverato in Ospedale per febbre elevata e cefalea, evidenziava condizioni generali compromesse, esantema maculo-papuloso diffuso, linfoadenomegalia, epatosplenomegalia; L'indagine epidemiologica non riferiva fattori di rischio per HIV e la ricerca degli anticorpi anti-HIV risultava negativa. Una biopsia linfonodale mostrava una corticale ridotta con rari follicoli, marcata proliferazione di istiociti con frequenti segni di eritrofagocitosi. Dopo 4 giorni compariva candidosi orale; l'antigene HIV p24 risultava positivo, la viremia molto elevata. E' stata diagnosticata sindrome emofagocitica in paziente con infezione acuta da HIV ed intrapresa terapia antiretrovirale. A 5 giorni dall'inizio della HAART, la sintomatologia d'esordio regrediva, e nei tre mesi successivi la viremia si azzerava.

E' stata individuata la fonte dell'infezione ed isolato il virus dal plasma e dai linfomonociti sia del donatore che del ricevente mediante co-coltura di PBMC privati dei CD8+.

Le caratteristiche biologiche dei virus isolati sono risultate indistinguibili sia per l'efficienza di replicazione (dosaggio della p24 nel sovrantante), che per l'utilizzo del corecettore (CCR5) determinato mediante infezione di cellule U87-CD4 esperimenti CCR5 o CXCR4.

Su entrambi gli isolati è stato dimostrato il polimorfismo I93L del gene della proteasi.

L'analisi molecolare condotta sulla regione del V3 mediante clonaggio e successiva analisi filogenetica ottenuta analizzando le correlazioni intra- ed inter-paziente mediante albero filogenetico "neighbour-joining program" ha dimostrato, nel donatore, la presenza di quasispecie altamente divergenti, mentre, nel ricevente una quasispecie virtualmente omogenea, fenomeno frequentemente dimostrato durante le fasi precoci dell'infezione da HIV, probabilmente dovuto ad una trasmissione a "collo di bottiglia".

La popolazione uniforme presente nel ricevente corrispondeva ad una popolazione minore delle quasispecie del donatore.

Le proprietà biologiche del virus isolato, insieme alla sequenza aminoacidica della regione del V3 (fenotipo M-