

## G032

### INFEZIONE PRODUTTIVA "IN VITRO" DI BIOPSIE CERVICALI E RETTALI DA PARTE DI ISOLATI PRIMARI DI HIV-1 DI TIPO SYNCITIU-INDUCING (SI) E NON SYNCITIU-INDUCING (NSI)

Di Stefano M.\*; Favia A. °.; Lisco A. °.; Caputi Iambrenghi O. §; Fiore JR. ° e Pastore G.

\*Clinica delle Malattie Infettive, Università di Foggia. °Clinica delle Malattie Infettive, Università di Foggia, § Clinica Chirurgica, Dipartimento di Emergenza e Trapianto d'Organo, Università di Bari.

**Introduzione:** L'evidenza epidemiologica che i rapporti sessuali sono responsabili dell'80% delle infezioni da HIV-1 conferma che la maggior parte delle trasmissioni avviene a livello mucosale; a tale livello la distribuzione dei maggiori corecettori per HIV-1 (CCR5 e CXCR4) è un fattore rilevante. A tal proposito descriviamo un modello "in vitro" utilizzato per lo studio della trasmissione di isolati primari di HIV-1 con diverso fenotipo biologico (SI e NSI) a frammenti biotici di mucosa cervicale o rettale non polarizzati.

**Materiali e metodi:** Sei frammenti biotici da mucosa rettale o sigmoidale e da mucosa endocervicale sono stati prelevati da otto pazienti HIV-1 sieronegativi e infettati con 1 ml di stock virale d'isolato primario NSI e SI pretrattati con DNase I e contenente 100-1000 TCID<sub>50</sub>. I frammenti biotici sono stati mantenuti in coltura secondo due differenti protocolli: A) una coltura di frammento biotico per ogni paziente/virus è stata interrotta dopo 7 giorni, lavata e co-coltivata con PBMCs PHA-stimolati da donatore sano; successivamente i frammenti biotici sono stati rimossi e i PBMCs mantenuti in coltura per 21 giorni. B) una coltura biotica per ogni paziente/isolato virale è stata mantenuta in coltura per 7 giorni. La attività replicativa virale era valutata mediante ricerca della transcriptasi inversa nel sovranatante di coltura.

**Risultati e conclusioni:** HIV-1 DNA provirale è stato evidenziato in tutte le biopsie endocervicali e rettali infettate sia con isolati di tipo SI che NSI; attività retrotrascrittasi è stata dimostrata in tutte le biopsie-colture sottoposte al protocollo di coltura B), solo dal 3° giorno dall'infezione, dimostrando l'assenza di carry-over dell'inoculo virale e la suscettibilità all'infezione di HIV-1 da parte delle biopsie cervicali e rettali. Inoltre, tutte le colture mantenute secondo il protocollo A hanno evidenziato la presenza di attività retrotrascrittasi dimostrando in tutti i casi il passaggio dell'infezione a PBMCs sani, e confermandola validità di questa metodica per lo studio dei meccanismi di trasmissione mucosale di HIV-1

## G033

### SHEDDING CERVICOVAGINALE DI HIV-1: CORRELATI CLINICI, IMMUNOLOGICI E TERAPEUTICI

Fiore JR.; ° Suligo B.; § Di Stefano M.; \* Lepera A.; Favia A.; Tateo M.; Lisco A.; Altini A.; Laddago V.; § Angarano G. e Pastore G.

Clinica di Malattie Infettive, Università di Bari, ° Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto Superiore di Sanità, Roma, § Clinica di Malattie Infettive, Università di Foggia, \* I Clinica Ginecologia e Ostetrica, Università di Bari, Italia.

**Introduzione:** La più diffusa modalità di trasmissione dell'

infezione da HIV-1 è quella eterosessuale; ad essa si aggiunge la trasmissione materno-fetale che rimane un'importante via di diffusione dell'infezione soprattutto nei paesi in via di sviluppo.

In entrambe i casi, la trasmissione del virus è dovuta al contatto diretto con il virus presente a livello del tratto genitale. La definizione dei livelli e dei fattori correlati allo shedding HIV-1 RNA nelle secrezioni cervico-vaginali ha importanti implicazioni nella definizione di strategie per la prevenzione dell'infezione da HIV.

**Obiettivi:** Valutare lo shedding di HIV-1 nelle secrezioni cervico-vaginali, i suoi correlati clinico-immunologici e gli effetti della terapia antiretrovirale, in un gruppo di donne infette senza evidenza di infezioni sessualmente trasmesse.

**Metodi:** Da 122 donne sono stati prelevati, campioni accoppiati di sangue periferico e lavaggi cervicovaginali (CVL). HIV-1 RNA è stato quantificato nel plasma e nella frazione acellulare dei CVL mediante NASBA (valore minimo rilevabile 80 copie/mL).

**Risultati:** Il 71% delle donne presentava una carica virale rilevabile in CVL, correlata alla carica virale plasmatica e al grado di immunodeficienza espresso dal numero assoluto di cellule CD4<sup>+</sup>. Le pazienti trattate con terapia antiretrovirale avevano un rischio minore di shedding del virus nel tratto genitale anche se tale associazione risultava limitata alle donne trattate con HAART. Inoltre, nel 25% di donne con carica virale plasmatica non rilevabile, è stato comunque dimostrato uno shedding genitale del virus.

**Conclusioni:** La carica virale plasmatica può non essere un indice affidabile dell'infettività delle secrezioni genitali. Inoltre, la terapia HAART sembra essere più efficace nella soppressione virale del livello di shedding genitale femminile che pertanto si conferma un compartimento distinto per la replicazione e l'evoluzione dell'HIV-1.

## G034

### LA QUANTIZZAZIONE DEL DNA DI HCMV MEDIANTE PCR COME INDICATORE DI PROGRESSIONE DELL'INFEZIONE NEL TRAPIANTO DI ORGANO SOLIDO

Franchi I., Zaccaria T., Barbui A., Varetto S., Giliberto G., Ghisetti V., Marchiaro G.

Dipartimento di Patologia Clinica, S.C. Microbiologia, Azienda Ospedaliera San Giovanni Battista, Molinette, Torino.

L'infezione da Citomegalovirus (CMV) è una importante causa di morbidità nei pazienti sottoposti a trapianto di organo solido: marcatori di progressione dell'infezione per trattare precocemente pazienti ad alto rischio sono fondamentali. Lo scopo dello studio è stato di valutare la cinetica dell'infezione in pazienti sottoposti a trapianto, attraverso una analisi quantitativa di CMV DNA mediante Polymerase Chain Reaction (qPCR, Cobas Amplicor Monitor) in modo da identificare indicatori di progressione dell'infezione.

**Metodi.** CMV-DNA è stato quantizzato nei leucociti (PBL) da prelievi seriali di sangue in 47 pazienti sottoposti a controllo dell'infezione da CMV nei primi 6 mesi dopo il trapianto.

**Risultati.** Alla quarta settimana i pazienti che sono stati trattati circa 15 giorni dopo per la presenza di sintomi da CMV (n=30) avevano un viral load significativamente più alto di quelli asintomatici (4 log<sub>10</sub>/1 milione di PBL vs. 2.8 log<sub>10</sub>, p<0.0001). Un viral load >4 log<sub>10</sub>/milione di PBL alla quarta settimana era associato ad un PPV di 100% e ad un

odds ratio di 45.37 per lo sviluppo successivo di malattia da CMV. Aumenti  $> 1 \log_{10}$  dalla prima comparsa di CMV DNA alla quarta settimana erano associati a progressione clinica dell'infezione (odds ratio 1.74). Il valore soglia di CMV-DNA di  $4 \log_{10}$  era particolarmente significativo per identificare nell'ambito dei pazienti R+/D- quelli che avrebbero sviluppato la malattia da CMV.

**Conclusioni.** L'infezione da CMV nel trapianto d'organo ha una dinamica molto rapida. Un  $>4 \log_{10}$  di CMV-DNA alla quarta settimana dal trapianto è altamente predittivo di progressione dell'infezione, così come incrementi  $> 1 \log_{10}$  dalla prima comparsa del DNA alla quarta settimana. Lo studio del viral load mediante qPCR consente di ottimizzare il trattamento precoce dell'infezione in pazienti ad alto rischio e assolve alle esigenze di standardizzazione di risultati di laboratorio per uso clinico

## G035

### IDENTIFICAZIONE DELLE DONNE IN GRAVIDANZA A RISCHIO DI TRASMISSIONE DELL'INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS: RITROVAMENTO DI INDICI A BASSA AVIDITA' DELLE IGG IN COMBINAZIONE A PARTICOLARI PROFILI DI REATTIVITA' DELLE IGM VERSUS LA SIEROCONVERSIONE DELLE IGG.

Gabrielli L.<sup>1</sup>, Lazzarotto T.<sup>1</sup>, Simone M.<sup>1</sup>, Grandi C.<sup>1</sup>, Bellucci T.<sup>1</sup>, Lanari M.<sup>2</sup>, Venturi V.<sup>2</sup>, Guerra B.<sup>3</sup>, Quarta S.<sup>3</sup>, Landini M.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. di Microbiologia, Laboratorio di Virologia

<sup>2</sup>Istituto Clinico di Pediatria Preventiva e Neonatologia

<sup>3</sup>Clinica Ginecologica e Ostetrica e Medicina dell'Età Prenatale Policlinico S.Orsola-Malpighi, Università degli Studi di Bologna

**Introduzione:** l'infezione da Citomegalovirus (CMV) rappresenta la causa principale di infezioni congenite da virus con una percentuale, in Italia, dell'1,1% di tutti i nati vivi. La trasmissione materno-fetale dell'infezione è legata principalmente all'infezione materna primaria che presenta un rischio di trasmissione approssimativamente del 40%.

**Scopo:** confronto delle percentuali di feti/neonati con infezione congenita, con presenza di sintomi clinici alla nascita e con comparsa di sequele tardive nati da donne con infezione primaria da CMV diagnosticata in gravidanza sulla base o 1) del ritrovamento di indici a bassa avidità delle IgG in combinazione a particolari profili di reattività delle IgM o 2) di accertata sieroconversione di anticorpi virus specifici.

**Metodologia:** tra il 1994 e il 2002, abbiamo saggiato 1309 campioni di siero provenienti da donne in gravidanza a rischio di trasmissione intrauterina di CMV. Nel circa 90% dei casi esse giunte alla nostra osservazione con un semplice sospetto di positività alle IgM. Presso il nostro laboratorio per ciascun campione abbiamo determinato l'indice di avidità delle IgG e studiato il profilo di reattività delle IgM anti-CMV mediante blot.

**Risultati:** in 71 casi abbiamo documentato la sieroconversione delle IgG virus specifiche. Nei restanti 1238 campioni di siero ottenuti da gravide con un sospetto di risultato positivo alle IgM anti CMV, la positività non è stata confermata in 662 casi (53.5%). Fra le 576 donne con sospetta positività delle IgM abbiamo diagnosticato un'infezione primaria da CMV in 279 casi (48.4%), un'infezione non primaria in 241(41.8%) casi ed infine un'infezione indefinita in 56 casi (9.8%). Fra le 71 donne con accertata sieroconversione, 24 (33.8%) sono stati i feti/neonati infetti. Fra le 257 donne con infezione primaria diagnosticata sulla base della bassa avidità

delle IgG e positività delle IgM con il blot l'infezione fetoneonatale è stata accertata in 76 casi (29.6%). Risultati simili sono stati ottenuti sulla presenza dei sintomi clinici alla nascita (10% versus 12.8%) e sulla comparsa delle sequele tardive (7.0% versus 8.2%).

**Conclusioni:** l'utilizzo combinato del blot e del test di avidità delle IgG eseguiti entro la 18a settimana di gestazione fornisce un valido strumento diagnostico in grado di identificare le donne a rischio di trasmissione intrauterina dell'infezione da CMV.

## G036

### L'INFEZIONE FETALE DA CITOMEGALOVIRUS.

Gabrielli L.<sup>1</sup>, Lazzarotto T.<sup>1</sup>, Magrini E.<sup>2</sup>, Foschini M.P.<sup>2</sup>, Simone M.<sup>1</sup>, Bellucci T.<sup>1</sup>, Eusebi V.<sup>2</sup>, Landini M.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. di Microbiologia, Laboratorio di Virologia,

Policlinico S.Orsola-Malpighi,

<sup>2</sup>Anatomia Patologica, Dipartimento di Oncologia,

Ospedale Bellaria, Università degli Studi di Bologna, Bologna

**Introduzione:** la trasmissione intrauterina dopo un'infezione materna primaria da Citomegalovirus (CMV) avviene nel 30-40% dei casi e il 10% dei neonati infettati sono sintomatici alla nascita. La diagnosi prenatale si propone di rilevare l'infezione in utero mediante il prelievo di liquido amniotico eseguito in 21° settimana di gestazione ed almeno 6-8 settimane dopo la sieroconversione materna. Il liquido amniotico viene sottoposto a ricerca diretta del virus mediante isolamento culturale e del genoma virale mediante PCR.

**Scopo:** verificare l'infezione da CMV nelle placenti e nei feti di 19 donne con infezione primaria avvenuta nel primo trimestre di gravidanza e con elevati carichi virali nel liquido amniotico.

**Metodologia:** la ricerca di CMV nelle placenti e nei feti è stata effettuata 1) con l'ematossilina-eosina identificando le tipiche inclusioni intranucleari che conferiscono alla cellula infetta l'aspetto "ad occhio di civetta" e 2) con l'immunostochimica utilizzando un anticorpo monoclonale verso gli antigeni virali precoci. La doppia colorazione immunostochimica ha permesso inoltre di identificare il tipo di cellule infette grazie alla contemporanea ricerca degli antigeni virali e cellulari. Gli organi fetali esaminati sono stati: encefalo, polmone, cuore, rene, pancreas, milza, fegato. L'interruzione volontaria di gravidanza è stata eseguita in 22° settimana di gestazione.

**Risultati:** gli esami istologici hanno identificato cellule infette in tutte le placenti esaminate. Le cellule placentali maggiormente interessate dall'infezione sono le cellule stromali. In tutti i feti almeno un organo è risultato infetto. Gli organi più frequentemente interessati dall'infezione sono il polmone ed il rene. La doppia colorazione immunostochimica ha evidenziato gli antigeni virali nelle cellule endoteliali, epiteliali, mesenchimali, nei neuroni, negli epatociti, ecc.

**Conclusioni:** nella trasmissione intrauterina da CMV un ruolo di fondamentale importanza è quello svolto dalla placenta a livello della quale il virus è in grado di replicarsi. Elevati carichi virali nel liquido amniotico sembrano essere sempre associati ad una compromissione fetale.