

Valutazione analitica e applicazione clinica di un metodo Real Time PCR per il dosaggio della carica virale di Epstein-Barr virus

Maria Teresa Bortolin, Chiara Pratesi, Rosamaria Tedeschi, Stefania Zanussi, Ettore Bidoli', Monica D'Andrea, Carlo Costanzo, Antonella Selva, Paolo De Paoli

U.O. di Microbiologia, Immunologia e Virologia e 'Epidemiologia, Centro di Riferimento Oncologico, Istituto Nazionale Tumori-IRCCS, Aviano (Pordenone)

Analytical evaluation and clinical application of a Real Time PCR assay for EBV viral load

Key Words: Epstein-Barr virus, Real Time PCR, Sensitivity, Reproducibility, Undifferentiated Carcinoma Nasopharyngeal Type, Human Immunodeficiency Virus, Autologous stem-cell transplantation

SUMMARY

We assessed the performance of a Real Time PCR assay to be used for EBV viremia evaluation in clinical specimens. Sensitivity and intra-/interassay reproducibility were evaluated by using DNA serial dilutions from the Namalwa cell line. EBV DNA was analyzed in serum samples from 39 patients (pts) with undifferentiated type nasopharyngeal carcinoma (UCNT), from 5 infectious mononucleosis (IM) pts and from 18 healthy donors. Results obtained by Real Time PCR were compared with those obtained by quantitative competitive (QC)-PCR assay. We thereafter measured the dynamics of EBV DNA load in 5 HIV-seropositive (HIV+) and 9 HIV-seronegative (HIV-, as controls) pts with lymphoma, treated with high-dose chemotherapy (HCT) followed by autologous stem-cell transplantation (ASCT).

We found a sensitivity of 100% at 10 EBV copies. The Spearman correlation for both the intra- and the inter-assay reproducibility was statistically significant ($r=0.99$; $p<0.01$) and the coefficients of variation (CV) were $<20\%$ for EBV viral load >20 copies/reaction and $>30\%$ for EBV viral loads <20 copies/reaction. No EBV DNA was detected in healthy donors. Higher EBV DNA loads were found by Real Time PCR (range 1173-46328 copies/ml) than by QC-PCR (range 450-5000 copies/ml) ($p<0.05$). 54% of UCNT and 100% of IM pts were EBV DNA positive. Two HIV+(40%) and 2 HIV-(22%) pts with lymphoma had detectable EBV viremia during the follow-up. The Real Time PCR is a suitable technique for high-throughput screening and frequent monitoring of patients at risk for developing EBV-associated diseases.

INTRODUZIONE

Il virus di Epstein-Barr (EBV) è un Gammaherpesvirus dal genoma a DNA lineare a doppio filamento di circa 172 kbp. Il virus infetta più del 90% della popolazione mondiale ed è l'agente eziologico della mononucleosi infettiva (IM). In una bassa percentuale di soggetti immunocompetenti da tempo è stata dimostrata la sua associazione con due neoplasie a distribuzione geografica ben definita (4): il linfoma di Burkitt (BL) e il carcinoma indifferenziato del nasofaringe (UCNT).

Nei soggetti con immunodeficienza congenita o acquisita, come i sieropositivi per HIV o i trapiantati d'organo o di cellule staminali emopoietiche del midollo osseo o del sangue periferico, studi più recenti hanno dimostrato il coinvolgimento del virus nella patogenesi di diverse neoplasie (4). Queste comprendono prevalentemente linfomi a carico dei linfociti B, come il linfoma non-Hodgkin (NHL), il linfoma di Hodgkin (HD) e le linfoproliferazioni post-trapianto, linfomi T cellulari, come i linfomi nasali a cellule T/natural

killer (NK), e carcinomi, come i leiomiomasarcomi. La diagnosi di laboratorio dell'infezione primaria o della riattivazione di EBV viene comunemente eseguita con test sierologici (12). Anche se questi metodi indiretti sono spesso utili e sufficienti per diagnosticare l'infezione primaria, per altre condizioni patologiche l'interpretazione dei risultati non è sempre facile e spesso non correla con i dati virologici e clinici (22).

Diversi studi hanno dimostrato che la ricerca del genoma virale rappresenta un parametro prognostico nei pazienti con patologie EBV-correlate, infatti la quantità del DNA di EBV nel sangue periferico, nel fluido cerebrospinale e in campioni biotici spesso correla con il decorso clinico di tali patologie (3, 14, 24, 25). È stato inoltre dimostrato che lo studio della dinamica della viremia EBV potrebbe essere utile nel valutare l'effetto di diversi approcci terapeutici, come nel caso delle terapie antivirali mediante l'uso di acyclovir o gancyclovir (10), la chemioterapia ad alte dosi seguita o meno da infusione di cellule staminali emopoietiche nei soggetti immunocompromessi

con linfomi (8, 13, 20) o la chemio- e/o radioterapia nei soggetti con UCNT (9).

Diversi gruppi di ricerca hanno sviluppato tecniche sempre più affinate per dosare il genoma di EBV nel sangue periferico e per monitorare diversi gruppi di pazienti a rischio di riattivazione virale. La maggior parte dei metodi si basa sul dosaggio del DNA virale nel sangue periferico, in quanto il genoma virale in questo fluido biologico, presente sia in forma virus-associata che episomale, è indice di riattivazione virale ed il campionamento è poco invasivo (21). I metodi tradizionali, ancora utilizzati in alcuni laboratori, comprendono la crescita *in vitro* di linfociti B EBV-infetti (19), l'ibridizzazione *in situ* utilizzando sonde di piccoli RNA di EBV (EBER) (11) e la PCR quantitativa competitiva (QC-PCR) (1, 15, 16, 18, 27). Diversi lavori più recenti hanno applicato una tecnica di quantificazione assoluta del DNA di EBV, basata sulla PCR in tempo reale (Real Time PCR) (6, 26).

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare la "performance" analitica di un metodo Real Time PCR per la determinazione del DNA di EBV e confrontarlo con un metodo tradizionale di QC-PCR, da noi precedentemente utilizzato (15), applicandolo a campioni di siero di pazienti con IM e UCNT.

Allo scopo infine di valutare il rischio di una riattivazione da EBV in pazienti gravemente immunocompromessi, lo stesso sistema è stato applicato allo studio di pazienti con infezione da HIV che hanno sviluppato linfomi, trattati con chemioterapia ad alte dosi (HCT) e trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche del sangue periferico (PBSCT).

MATERIALI E METODI

Curva standard, sensibilità e riproducibilità

La curva standard è stata allestita da diluizioni seriali, corrispondenti a $5-50-5 \times 10^2-5 \times 10^3$ copie di EBV, di DNA a titolo noto estratto con solventi organici dalla linea cellulare di BL, chiamata Namalwa. Queste cellule sono EBV-infette e portano stabilmente due copie di EBV ciascuna (5). Il DNA è stato dosato allo spettrofotometro (GeneQuant II) e la quantità del DNA convertita in numero di copie di DNA di EBV.

Per valutare rispettivamente la sensibilità e la riproducibilità del metodo, sono state eseguite alcune ripetizioni di diverse quantità di virus, da 2.5 a 10 copie di EBV e da 2.5 a 2×10^6 copie di EBV/reazione, rispettivamente.

Campioni

Sono stati esaminati 39 campioni di siero di pazienti con UCNT, 5 di pazienti con IM e 18 di donatori.

Inoltre, a partire dal 2001 nella nostra Unità Operativa, in collaborazione con il reparto di Oncologia Medica e AIDS, è cominciato l'arruolamento di pazienti HIV+ con linfoma non Hodgkin (NHL) e con linfoma di Hodgkin (HD), refrattari alla terapia di prima linea e/o ricaduti, allo scopo di valutare il recupero immunologico e virologico dopo HCT in supporto di PBSCT (20). Campioni di pazienti con pari caratteristiche e HIV- sono stati raccolti come controlli. Sono stati esaminati 14 soggetti, 5 HIV+ e 9 HIV-, monitorando ciascuno prima, durante e dopo il trapianto di cellule staminali. Tali dosaggi erano previsti al momento dell'arruolamento (T=0), al momento della raccolta dei linfociti del sangue periferico (T=1), prima delle alte dosi di chemioterapia (T=2), circa 10-15 giorni dopo la reinfusione dei linfociti periferici (T=3) e a 2 mesi dalla reinfusione (T=4).

Estrazione del DNA da campioni di siero

Allo scopo di ottimizzare la quantificazione assoluta della carica virale di EBV nel siero di campioni clinici mediante Real Time PCR, sono state valutate le efficienze di due metodi di estrazione, uno commerciale (QIAamp DNA Mini kit, QIAGEN) e uno tradizionale in cui venivano impiegati solventi organici, previa precipitazione delle particelle virali con soluzione di polietilenglicole (PEG) (2).

Il secondo metodo di estrazione prevede un primo passaggio in cui vengono precipitati per 1 ora in ghiaccio 200 μ l di siero in 200 μ l di soluzione al 20% di PEG. Il campione viene centrifugato a 4°C per 40 minuti e la parte liquida viene eliminata. Le cellule vengono poi lisate, incubando il campione per tutta la notte a 42°C con 400 μ l di soluzione costituita da Tris-Cl 10 mM pH8, EDTA 0.1 M pH8, SDS 0.5% e 20 mg/ml di Proteinasi K (Promega). Dopo due estrazioni con fenolo/cloroformio/alcool isoamilico nel rapporto 25/24/1, la soluzione acquosa viene fatta precipitare con glicogeno 10%, acetato di sodio 3 M pH5.2 e alcool etilico 100% per 1 ora a -20°C. Previa centrifugazione a 4°C per 40 minuti, il pellet viene lavato con etanolo 70% e risospeso in 50 μ l di acqua sterile e priva di RNasi e DNasi.

In parallelo, sono state estratte con entrambi i metodi e dosate in Real Time PCR 16 quantità di EBV DNA a titolo noto, estratte da pazienti con IM.

Sierologia EBV

La reattività anticorpale è stata rilevata mediante ELISA basato su antigeni EBV ricombinanti (Biotest EA, EBNA-1 e IgM VCA). Per una valutazione semiquantitativa, i risultati sono stati espressi in bassa positività (1+: OD fino a 1000), positività intermedia (2+: OD tra 1000 e 1500) e

forte positività (3+: OD>1500). In presenza di aumento significativo di IgG anti-EA (2 o 3+) insieme a positività di IgG anti-EBNA-1 c'è indicazione di possibile riattivazione di EBV.

Quantificazione del DNA di EBV

Il metodo di QC-PCR, già descritto dettagliatamente (15), si basa sulla coamplificazione del DNA dei campioni con diluizioni seriali a titolo noto di un competitore standard, contenente la stessa sequenza di riconoscimento dei primer del campione, un frammento della regione LMP-2A con una delezione interna di 28 basi (Diatech, Italia). L'interpretazione dei risultati è stata effettuata mediante risoluzione di 20 µl di ciascun prodotto di PCR dopo elettroforesi su gel di poliaccrilammide e lettura dell'intensità relativa della fluorescenza dei frammenti colorati con etidio bromuro mediante densitometro (QuantityOne, BIORAD).

Il sistema di quantificazione assoluta del DNA di EBV mediante Real Time PCR utilizza una sonda TaqMan marcata con due fluorocromi e l'enzima TaqGold polimerasi (23). Viene amplificato un frammento di 65bp del gene LMP-1 del genoma di EBV, mediante lo strumento ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Le sequenze dei primer a monte e a valle e della sonda sono:

5'-AAGGTCAAAGAACAAGGCCAAG-3', 5'-GCATCGGAGTTCGGTGGG-3' e 5'-FAM-AGGAGCGTGTCCCCGTGGAGG-TAMRA-3'.

La reazione di PCR viene eseguita in una miscela finale di 25 µl, contenente 5 µl di campione, Universal PCR Mastermix 2X (Applied Biosystems), 1.5 mM di cloruro di magnesio, 900 pmoli di ciascun primer e 175 pmoli di sonda. Le condizioni di reazione sono: 50°C per 2 minuti, 95°C per 10 minuti e 50 cicli a 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 min. La mix contiene anche l'enzima uracil N-glicosilasi (UNG), che previene l'amplificazione dei prodotti di PCR, amplificati in una seduta precedente.

In ogni esperimento i campioni vengono amplificati in triplicato, con l'aggiunta nel terzo pozzetto di un controllo d'amplificazione a titolo noto (500 copie di EBV), insieme alle 4 quantità della curva standard. In ciascuna piastra da 96 pozzetti sono stati sempre aggiunti un controllo positivo a titolo noto (500 copie di EBV) e uno negativo entrambi in triplicato.

Analisi statistica

Il test di correlazione di Spearman è stato applicato per comparare la media delle copie di EBV ottenute mediante Real Time PCR dagli esperimenti di riproducibilità intra-/interassay con le copie di EBV attese. È stato calcolato il test non

parametrico di Mann-Whitney per il confronto del dosaggio della viremia EBV ottenuto mediante QC-PCR e Real Time PCR tra gruppi di pts con IM e UCNT. Il test di Wilcoxon per dati appaiati e la correlazione non parametrica di Spearman sono stati utilizzati con comparare il dosaggio della viremia mediante Real Time PCR ottenuto da due diversi metodi di estrazione.

RISULTATI

Confronto dei due metodi di estrazione

Rispetto al metodo commerciale (QIAamp DNA Mini kit, QIAGEN), l'estrazione mediante solventi organici, a parità di resa (correlazione di Spearman: $r=0.83$; $p<0.01$; test per dati appaiati di Wilcoxon: $p=0.24$) (tabella 1) ha consentito di ottenere una percentuale minore di campioni inibiti. È stato dimostrato che la percentuale di inibizione ottenuta con il metodo commerciale è del 100% in 6/16 (38%) campioni e del 60% in 10/16 (63%) campioni. Anche il metodo d'estrazione basato su solventi organici in una percentuale consistente di casi (8/16=50%) ha dato inibizione, ma inferiore del 20%. Nella maggior parte dei campioni (62%) l'estrazione con solventi organici ha permesso l'amplificazione dei campioni in tutti e tre i punti del triplicato, aumentando l'attendibilità del risultato e per nessun campione c'è mai stata inibizione totale.

Riproducibilità della quantificazione di EBV DNA mediante Real Time PCR

Gli esperimenti di riproducibilità intra- ed interassay nell'intervallo di $2.5-2 \times 10^6$ e $5-2 \times 10^6$ copie di virus/reazione sono stati riportati in tabella 2. La riproducibilità è più elevata per concentrazioni di virus maggiori alle 200 copie di EBV/reazione, con coefficienti di variazione (CV) inferiori al 20%. Per concentrazioni di virus inferiori alle 20 copie di EBV/reazione il metodo invece è meno riproducibile. I CV sono maggiori del 30% per ripetizioni nella stessa seduta e maggiori del 60% per ripetizioni tra sedute diverse.

Le medie delle copie di EBV/reazione ottenute sia nelle prove intra- che interassay correlano comunque significativamente con quelle attese (correlazione di Spearman: $r=0.99$; $p<0.01$).

Sensibilità e specificità della Real Time PCR per la quantificazione di EBV DNA

Il metodo è in grado di rilevare nel 100% delle ripetizioni 10 copie di EBV/reazione, nell'83% e 67% delle ripetizioni 5 e 2.5 copie di EBV/reazione, rispettivamente. Nessuno dei 18 campioni di siero di donatori è risultato EBV DNA positivo.

Sierologia EBV

Per quel che concerne i 14 pazienti immunocompromessi analizzati, tutti avevano anticorpi verso

EBV e 6/12 (50%) pazienti avevano un quadro sierologico compatibile con riattivazione da EBV. In tabella 3 sono stati riportati i risultati della risposta anticorpale verso EBV per 4 pazienti immunocompromessi valutati per viremia EBV.

Dosaggio di EBV DNA nel siero di campioni con IM e UCNT e confronto tra Real Time PCR e QC-PCR

Circa il 54% (21/39) e il 100% (5/5) dei campioni di siero di pazienti con UCNT e IM, rispettivamente, è risultato EBV DNA positivo con livelli di virus significativamente superiori, rispetto al metodo di QC-PCR.

In figura I sono riportati i risultati riguardanti il confronto del dosaggio di EBV DNA mediante Real Time PCR e QC-PCR su 3 campioni di siero di stessi pazienti con IM. Per tutti 3 i campioni la Real Time PCR è in grado di rilevare concentrazioni di virus significativamente più elevate (intervallo: 8550-46328 copie EBV/ml siero), rispetto alla PCR tradizionale (intervallo: 937-5000 copie EBV/ml siero) (p<0.01).

Dal confronto delle mediane delle copie di EBV/ml di siero ottenute mediante entrambi i metodi per campioni di siero di pazienti diversi con UCNT e IM, si dimostra anche in questo caso che il dosaggio mediante Real Time PCR consente di ottenere per entrambi i gruppi di pazienti concentrazioni virali significativamente superiori rispetto a quelle ottenute mediante il metodo non cinetico (figura II) (p<0.01).

Dosaggio di EBV DNA nel siero di campioni con linfomi trattati con HCT e sottoposti a PBSCT

Il 28.6% (4/14) dei pazienti immunocompromessi ha presentato viremia EBV rilevabile nel siero, di cui il 40% (2/5) HIV+ e il 22% (2/9) HIV-. La tabella 3 riporta inoltre i valori di viremia EBV per i 4 pazienti EBV DNA positivi e li confronta con i dati sierologici e la viremia HIV. Tre pazienti presentano viremia EBV prima e un paziente dopo il trapianto delle cellule staminali periferiche. Solo in due pazienti i livelli di viremia EBV sono molto elevati: un paziente HIV+ con NHL prima del trapianto e un paziente HIV- con NHL prima, durante e dopo il trapianto. La riattivazione sierologica non sempre è associata alla viremia EBV. Per il paziente HIV+ con HD, la viremia EBV dopo il trapianto si associa ad una viremia HIV molto elevata. Il monitoraggio a due mesi dal

trapianto evidenzia la mancanza di riattivazione virale per tutti i pazienti.

Tabella 1. Quantificazione di EBV DNA mediante Real Time PCR in campioni di IM dopo estrazione con due diversi sistemi

Campioni	(EBV copie/ml)	
	QIAGEN	Solventi organici
1	16060	32990
2	4214	8958
3	..a	5248
4	1563	2034
5	3168	11408
6	2923	2240
7	1274	660
8	..a	448
9	3128	8093
10	..a	3824
11	..a	2461
12	2434	137
13	4000	4700
14	..a	9140
15	3900	2718
16	..a	1160

Correlazione di Spearman: r=0.83, p<0.01

Test per dati appaiati di Wilcoxon: p=0.24

..: campione completamente inibito

Tabella 2. Precisione intra- e interassay del metodo Real Time PCR

EBV copie/reazione	Riproducibilità			
	Intra-assay		Interassay	
	Media EBV copie/reazione	% CV	Media EBV copie/reazione	% CV
2.5	6.9	37.6	n.e.	n.e.
5.0	13.2	60.7	9.6	69.4
20.0	26.9	40.9	22.7	60.6
200.0	188.2	6.2	176.6	14.1
2,000.0	1,939.3	7.1	2,119.7	1.3
20,000.0	25,363.6	0.1	24,398.1	0.7
200,000.0	246,163.3	5.2	226,534.9	2.4
2,000,000.0	2,583,915.0	5.6	2,415,883.0	8.7

Correlazione di Spearman: r=0.99, p<0.01

n.e. =analisi non eseguita

Figura I. Confronto del dosaggio di EBV DNA mediante Real Time PCR e QC-PCR in 3 sieri di pazienti con IM

Test non parametrico di Mann-Whitney: p<0.01

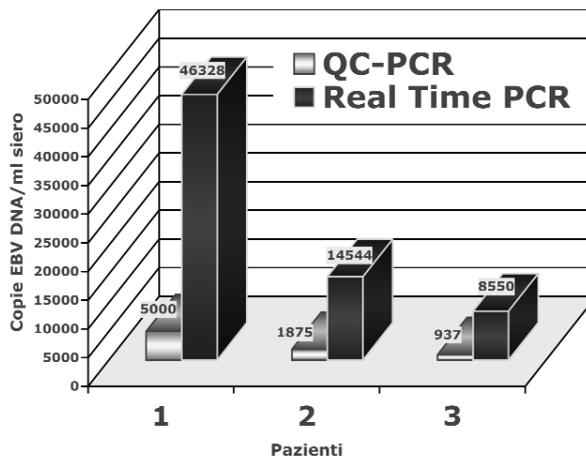
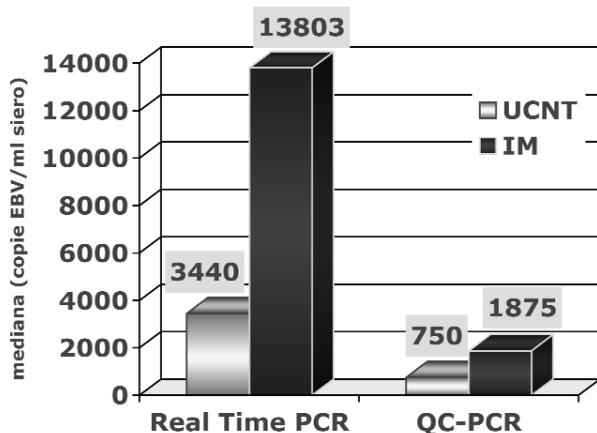


Figura II. Confronto tra mediane di EBV DNA mediante QC-PCR e Real Time PCR in campioni di siero di pazienti con UCNT e IM

Test non parametrico di Mann-Whitney: $p < 0.01$



amplificazione.

Con questa metodica è stato possibile analizzare, mediante una serie di ripetizioni a concentrazioni diverse di virus, la sensibilità e la riproducibilità con minor laboriosità rispetto ai metodi quantitativi di PCR tradizionali. La sensibilità del metodo è di 250 copie di EBV/ml di siero. I valori dei coefficienti di variabilità ottenuti dai saggi intra-/interassay sono risultati buoni e in accordo con altri studi di Real Time PCR applicata al dosaggio di EBV (7, 17).

L'aggiunta di un controllo d'inibizione a titolo noto (500 copie di EBV), nel terzo pozzetto di ciascun campione analizzato in triplicato, ha reso possibile il controllo interno dell'amplificazione. Questo accorgimento ha permesso di individuare campioni falsi negativi e di normalizzare il dosaggio dei campioni parzialmente inibiti, mediante

una semplice equazione.

Prima di dosare i campioni è stata valutata l'efficienza di due metodi di estrazione, migliorando l'accuratezza e la riproducibilità del dosaggio del carico virale di EBV nei campioni. La scelta di utilizzare siero o plasma, come materiale su cui effettuare i dosaggi, si è basata su diversi studi anche recenti che dimostrano il valore prognostico del carico virale su tali liquidi biologici

Tabella 3. Confronto tra viremia EBV, sierologia e viremia HIV in 4 pts immunocompromessi

Pts	T	Diagnosi	Sierologia EBV			Viremia EBV		Viremia HIV
			IgG anti-EA	IgG Anti-EBNA	IgM Anti-VCA	Interpretazione (copie/ml)	(copie/ml)	
2	0	HIV+NHL	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	<250	<50
	1		R1	R2	NEG	IP	29125	<50
	2		NEG	R3	NEG	IP	<250	<50
	3		R2	R3	NEG	IR	<250	<50
	4		n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	<250	n.e.
3	0	HIV-NHL	NEG	R3	NEG	IP	<250	
	1		NEG	R2	NEG	IP	3490	
	2		R1	R3	POS	IR	19600	
	3		n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	11780	
	4		NEG	R3	NEG	IP	<250	
4	0	HIV-NHL	R2	R3	NEG	IR	443	
	1		n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	<250	
	2		R1	R3	NEG	IP	<250	
	3		R1	R3	NEG	IP	<250	
	4		n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	<250	
11	0	HIV+HD	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	<250	<50
	1		R1	R2	NEG	IP	<250	<50
	2		R1	R3	POS	IR	<250	<50
	3		n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	320	>500000
	4		NEG	R3	NEG	IP	<250	<50

T = tempo dall'arruolamento; IP = infezione pregressa; IR = infezione riattivata
n.e. = analisi non eseguita

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Allo scopo di monitorare pazienti a rischio di riattivazione di EBV, abbiamo valutato un metodo di quantificazione assoluta basato sulla Real Time PCR, amplificando un frammento di 65bp del gene LMP-1 di EBV. LMP-1 è un gene presente in unica copia nel genoma di EBV e questo consente, rispetto ai metodi che utilizzano regioni del genoma reiterate come BamHI W (25), di ottenere risultati più accurati. Questo metodo consente di analizzare 24 campioni, in triplicato per ogni seduta della durata di 2 ore ciascuna, riducendo la possibilità di contaminazione tra una seduta e l'altra (carry-over), in quanto essendo un sistema chiuso vengono eliminate tutte le procedure post-

ci in pazienti con UCNT (9, 25).

Per quel che concerne l'applicazione del metodo Real Time PCR in gruppi di pazienti con patologie EBV-correlate, dai nostri risultati si evince che il 54% e il 100% dei pazienti con UCNT e IM, rispettivamente presentano viremia EBV nel siero, con valori di viremia più elevati, rispetto a quelli ottenuti mediante QC-PCR.

L'analisi della dinamica della viremia di EBV mediante Real Time PCR nel siero dei 14 pazienti immunocompromessi, che hanno concluso il ciclo terapeutico, indica che 4 pazienti (28.6%) presentano viremia EBV. Solo due di questi, però, un soggetto HIV+ con NHL e un soggetto HIV-con NHL, presentano livelli di EBV DNA molto elevati. Per quanto riguarda la mancanza di corre-

lazione tra riattivazione sierologica e viremia EBV, il nostro dato è in linea con quanto descritto in letteratura (15). Dati recenti suggeriscono, però, l'utilità di associare marcatori sierologici e molecolari per valutare il rischio di linfoprolifera- zione post-trapianto nei trapiantati (3). Inoltre, dal monitoraggio a due mesi dal trapianto delle cellule staminali, nessun paziente presenta viremia EBV nel siero. La bassa riattivazione di EBV potrebbe essere dovuta ad un monitoraggio troppo ravvicinato all'inizio della terapia, oppure al tipo di terapia immunosoppressiva, che conduce ad un drastico abbattimento dei linfociti B periferici (28). Per comprendere meglio la dinamica della viremia EBV e lo status generale di questi soggetti, sarà necessario monitorare la dinamica della viremia EBV dopo sei e dodici mesi dalla terapia, ampliando l'analisi anche ai linfociti del sangue periferico e integrando la quantificazione del carico di EBV con altri parametri, di natura virologica e immunologica.

BIBLIOGRAFIA

- Bai X, Hosler G, Rogers B, Dawson DB, Scheuermann RH. Quantitative polymerase chain reaction for human herpesvirus diagnosis and measurement of Epstein-Barr virus burden in post transplant lymphoproliferative disorder. *Clin Chem* 1997; 43: 1843-9.
- Bortolin MT, Zanussi S, Tedeschi R, et al. Evaluation of three molecular biology-based assays for the detection of GB Virus C/Hepatitis G Virus in clinical specimens. *Intervirology*, 2003: in press.
- Carpentier L, Tapiero B, Alvarez F, Viau C, Alfieri C. Epstein-Barr virus (EBV) early-antigen serologic testing in conjunction with peripheral blood EBV DNA load as a marker for risk of post transplantation lymphoproliferative disease. *JID*, 2003; 188: 1853-64.
- Crawford DH. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. *Phil Trans R Soc Lond B*, 2001; 356: 461-71.
- Gargano S, Caporossi D, Gualandi G, Calef E. Different localization of Epstein-Barr virus genome in two subclones of Burkitt lymphoma cell line Namalwa. *Genes Chromosomes Cancer*, 1992; 4: 205-10.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 1996; 6: 986-94.
- Imashuku S, Goto T, Matsumura T, et al. Unsuccessful CTL transfusion in a case of post-BMT Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorder (EBV-LPD). *Bone Marrow Transpl* 1997; 20: 337-40.
- Ledergerber B, Telenti A, Egger M. Risk of HIV related Kaposi's sarcoma and non-Hodgkin's lymphoma with potent antiretroviral therapy: prospective cohort study. *Swiss HIV Cohort Study. BMJ* 1999; 319: 23-4.
- Lo YM, Leung SF, Chan LY, et al. Kinetics of plasma Epstein-Barr virus DNA during radiation therapy for nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2000; 60: 2351-5.
- Luxtopn JC, Williams I, Weller I, Crawford DH. Epstein-Barr virus infection of HIV-seropositive individuals is transiently suppressed by high-dose acyclovir treatment. *AIDS* 1993; 7: 1337-43.
- Nakazawa Y, Chisuwa H, Ikegami T, et al. Efficacy of quantitative analysis of Epstein-Barr virus-infected peripheral blood lymphocytes by in situ hybridization of EBER1 after living-related liver transplantation: a case report. *Transplantation* 1997; 63: 1363-6.
- Ooka T, de Turenne-Tessier M, Stolzenberg. Relationship between antibody production to Epstein-Barr virus (EBV) early antigens and various EBV-related diseases. *Springer Sem Immunopath*, 1991; 13: 133-247.
- Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *HIV Outpatient Study Investigators. N Engl J Med* 1998; 338: 853-60.
- Pedneault L, Katz BZ. Comparison of polymerase chain reaction and standard Southern blotting for the detection of Epstein-Barr virus DNA in various biopsy specimens. *J Med Virol* 1993; 39: 38-43.
- Pratesi C, Bortolin MT, D'Andrea M, et al. Quantitative plasma/serum EBV DNA load by LMP2A determination in an Italian cohort of NPC patients. *J Clin Virol* 2003; 28(2): 155-64.
- Riddler SA, Breinig MC, McKnight JL. Increased levels of circulating Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocytes and decreased EBV nuclear antigen antibody responses are associated with the development of post transplant lymphoproliferative disease in solid-organ transplant recipients. *Blood* 1994; 84: 972-84.
- Rooney CM, Smith CA, Ng Cy, et al. Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* 1995; 345: 9-13.
- Rowe DT, Qu L, Reyes J, et al. Use of quantitative competitive PCR to measure Epstein-Barr virus genome load in the peripheral blood of pediatric transplant recipients with lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1612-5.
- Savoie A, Perpete C, Carpentier L, Joncas J, Alfieri C. Direct correlation between the load of Epstein-Barr virus-infected, lymphocytes in the peripheral blood of pediatric transplant recipients and risk of lymphoproliferative disease. *Blood* 1994; 83: 2715-22.
- Simonelli C, Michieli M, Bortolin MT, et al. Virological and immunological parameters during High-dose Chemotherapy (HCT) and autologous stem-Cell transplantation (ASCT) in HIV-infected patients (pts) affected by lymphoma. *Global research for global eradication, International Meeting of the Institute of Human Virology, Sept.29-Oct.3, 2003. Baltimore Waterfront Marriott; Abstract n. 205: 61.*
- Stevens SJ, Middeldorp JM. Nucleic acid-based diagnostic approaches in EBV-associated disease. *EBV report* 2001, 8: 31-40.
- Sumaya CV. Serological testing for Epstein-Barr virus: Developments in interpretation. *J Inf Dis*, 1985; 151: 984-7.
- Tedeschi R, Enbom M, Bidoli E, Linde A, De Paoli P, Dillner J. Viral load of human herpesvirus 8 in peripheral blood of human immunodeficiency virus-infected patients with Kaposi's sarcoma. *J Clin Microbiol* 2001; 39(12): 4269-73.
- Telenti A, Marshall WF, Smith TF. Detection of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction. *J Clin Microb* 1990; 28: 2187-90.

25. To E, Chan A, Leung S, et al. Rapid clearance of plasma Epstein-Barr virus DNA after surgical treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 3254-9.
26. Williams PM, Williams SJ, Schwer C, Heid C, Karger BL, Williams PM. Real time quantitative PCR. Quantitative competitive polymerase chain reaction: analysis of amplified products of the HIV-1 gag gene by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Genome Res* 1996; 6: 146-52.
27. Yamamoto M, Kimura H, Hironaka T, et al. Detection and quantification of virus DNA in plasma of patients with Epstein-Barr virus-associated diseases. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1765-8.
28. Yang J, Tao Q, Flinn IW, et al. Characterization of Epstein-Barr virus-infected B cells in patients with post transplantation lymphoproliferative disease: disappearance after rituximab therapy does not predict clinical response. *Blood*, 2000; 96(13): 4055-63.

Maria Teresa Bortolin
Unità Operativa di Microbiologia,
Immunologia e Virologia
Centro di Riferimento Oncologico,
Istituto Nazionale Tumori-IRCCS, Aviano (PN)
Via Pedemontana Occidentale, 12
33081 Aviano (PN)-Italia
Te.: +39 (0)434 659421;
Fax: +39 (0)434 653402
Indirizzo E-mail: micro@cro.it