

**CO5.4****QUANTIZZAZIONE DI DNA DI POLIOMAVIRUS BK NEL SANGUE DI PAZIENTI TRAPIANTATI DI RENE CON NEFROPATIA BK-CORRELATA****<sup>1</sup>Furione M., <sup>1</sup>Baldanti F., <sup>1</sup>Gatti M., <sup>2</sup>Tarantino A., <sup>2</sup>Fogazzi G.B., <sup>1</sup>Rovida F., <sup>1</sup>Gerna G.**

<sup>1</sup>IRCCS Policlinico San Matteo, Servizio di Virologia, Pavia;  
<sup>2</sup>IRCCS Ospedale Maggiore, Divisione di Nefrologia, Milano.

**Scopo:**

L'obiettivo dello studio è stata la messa a punto di un test molecolare per la diagnosi di nefropatia BK-correlata in pazienti trapiantati di rene. A tal fine, è stato sviluppato un saggio per la quantizzazione del DNA di poliomavirus BK su sangue periferico e urine.

**Metodo:**

Tale metodica è basata sull'utilizzo di un controllo interno di reazione (plasmide composto da una sequenza eterologa di DNA fiancheggiata dalla sequenza target riconosciuta da primers omologhi a una sequenza conservata del gene di poliomavirus "large T-antigen") e di standard esterni di quantificazione (differenti quantità di plasmide che veicola il frammento del gene "large T-antigen" amplificato mediante PCR).

Nell'ambito dei poliomavirus umani le sequenze di BK virus e di JCV sono state differenziate mediante sequenziamento. Sul sedimento urinario, inoltre, è stata eseguita la quantizzazione delle "decoy cells".

**Risultati:**

Sono stati analizzati mediante PCR i campioni di sangue e urine raccolti dal gennaio 2000 al dicembre 2002 su una coorte di 201 trapiantati di rene.

Di questi, 106 presentavano una funzionalità renale alterata, e 95 una funzionalità normale. Quattordici pazienti (6.9%) sono risultati PCR-positivi nel sangue (livelli mediani: 500 copie/ml, range <1000-50,000). Tutti i pazienti positivi per DNA nel sangue avevano alterazione della funzionalità renale.

Di questi 4/7 (57.1%) risultavano positivi per la ricerca di antigeni di poliomavirus all'immunostochimica.

Gli stessi mostravano un alto livello di decoy cells" sul sedimento urinario (>5/50 cellule per campo 400x). La ricerca di DNA nelle urine risultava positiva in 116/189 pazienti (61.4%).

**Conclusioni:**

La quantizzazione di DNA di poliomavirus è una metodica sensibile e specifica per la diagnosi di nefropatia BK-correlata. Viceversa, la presenza di DNA virale nelle urine ha scarso significato clinico.

**CO5.5****REAL-TIME PCR PER IL VIRAL LOAD DI CITOMEGALOVIRUS NEL TRAPIANTO D'ORGANO: CONFRONTO CON ANTIGENEMIA E PCR END-POINT.****Zaccaria T.; Enrietto M; Pittaluga F; Ghisetti V; Marchiaro G.**

S.C. Microbiologia  
Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista di Torino,  
c.so Bramante 88/90 - 10126 Torino

Nel trapianto d'organo, il monitoraggio dell'infezione da CMV mediante la ricerca dell'antigene pp65 è soffre di importanti variabili: manualità, tempi lunghi di esecuzione, esperienza nella lettura e interpretazione dei risultati. I sistemi per la misurazione del viral load di CMV mediante PCR end-point, parzialmente automatizzati, consentono risultati oggettivi più precocemente dell'antigenemia, richiedono tempi lunghi e hanno un range dinamico ristretto.

Lo scopo del lavoro è stato confrontare la quantizzazione del viral load di CMV mediante real-time PCR (RT-PCR, AmpliMedical, Buttigliera, To) con l'antigenemia e la quantizzazione mediante PCR end-point (COBAS Amplicor Monitor, Roche), nei leucociti (n=144) di 30 pazienti trapiantati con infezione da CMV (18 sintomatici e trattati e 12 asintomatici, non trattati).

Per valutare la sensibilità e specificità della RT-PCR sono stati saggiati rispettivamente 59 campioni positivi mediante antigenemia e/o COBAS e 58 campioni negativi in nested PCR per CMV DNA e COBAS. C'è stata una buona correlazione tra RT-PCR e COBAS (r=0.774) e con antigenemia (RT-PCR r=0.693, COBAS r=0.729). La sensibilità di RT-PCR rispetto a COBAS è stata del 94.5%, la specificità dei due sistemi rispetto alla nested PCR di 98.3% e 91.5%. I valori di viral load hanno mostrato andamento simile, con risultati più alti nei pazienti sintomatici (mediana RT-PCR: 3.5 log<sub>10</sub>/500.000 cellule, COBAS 3.9 logs) che in quelli asintomatici (2.0 logs in RT-PCR contro 3.1 logs con COBAS). Per valori di antigenemia corrispondenti a 0, da 1 a 10, da 11 a 100 e da 101 a 1000/200.000 leucociti sono risultati i seguenti valori mediani di DNA mediante RT-PCR: 20 copie/500.000 (COBAS: 615), 60 (COBAS: 857), 640 (COBAS: 5900) e 4300 (COBAS: 9750).

In conclusione, la RT-PCR è metodo molto sensibile e specifico, con un turnaround time più basso rispetto alla PCR end-point (3 ore contro 7) e più agevole per diagnosi tempestive.