

P152**SVILUPPO DI UN SAGGIO DI REAL-TIME PCR PER LA QUANTIFICAZIONE DEL DNA DI HPV IN CAMPIONI CITOLOGICI CERVICALI**

Ambretti S., Venturoli S., Cricca M., Filippone C., Delbarba S., Manaresi E., Musiani M., Zerbini M.

Dip. di Medicina Clinica, Specialistica e Sperimentale, Sez. di Microbiologia, Università di Bologna, Via Massarenti 9, 40138 Bologna.

L'infezione da Papillomavirus Umani (HPV) ad alto rischio oncogeno costituisce un importante fattore di rischio per l'insorgenza di lesioni displastiche a livello della cervice uterina e per la progressione in senso neoplastico di tali lesioni. Negli ultimi anni è emersa la necessità di valutare l'associazione fra carica virale e storia naturale delle lesioni cervicali HPV-correlate. A questo scopo abbiamo messo a punto un saggio di Real Time PCR, in formato Sybr Green, in grado di quantificare il DNA di HPV presente in campioni citologici cervicali e di fornire un risultato normalizzato per numero di cellule grazie alla quantificazione del gene housekeeping gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi (GAPDH).

Per l'identificazione di un ampio numero di HPV rilevabili in lesioni premaligne, abbiamo studiato un pool di primer di consenso che consente l'amplificazione di un frammento della regione L1 del DNA di 8 importanti genotipi mucosi ad alto rischio oncogeno (16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58) e dei 2 principali genotipi a basso rischio (6, 11). Il saggio consente non solo la quantificazione del DNA di HPV ma anche la genotipizzazione mediante analisi delle curve di melting.

Il GAPDH viene amplificato in una reazione separata da una coppia di primer specifici. La quantificazione di un gene housekeeping permette di effettuare una valutazione del DNA di HPV che tenga conto della variabilità per numero di cellule dei campioni in esame.

Per la validazione della tecnica sono stati utilizzati per per l'HPV plasmidi contenenti la regione L1 del DNA dei 10 genotipi studiati, per il GAPDH DNA genomico umano.

Il saggio è stato quindi utilizzato per analizzare 30 campioni citologici cervicali provenienti da donne con lesioni di diverso grado (ASCUS, LSIL, HSIL). I risultati indicano come la Real-Time PCR da noi sviluppata sia una tecnica altamente sensibile e riproducibile e possa quindi essere utile nello studio della correlazione fra carica virale e rischio di progressione neoplastica.

P153**DIAGNOSI DI INFEZIONE DA VIRUS DELL'APPARATO RESPIRATORIO: TRE METODI A CONFRONTO.**

Arcangeletti M.C., De Conto F., Pinardi 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

Obiettivo principale di questo studio è quello di individuare, nell'ambito delle indagini di laboratorio considerate, quella maggiormente efficace per il rilevamento di virus dell'apparato

respiratorio.

Materiali e Metodi

Le indagini virologiche condotte presso l'Unità di Virologia (Sezione di Microbiologia) di Parma, si riferiscono a 3260 campioni clinici costituiti da secrezioni respiratorie, prelevate a mezzo di tampone o mediante aspirazione ed analizzate in un arco di tempo di 5 anni (1999-2003).

L'immunofluorescenza è stata impiegata sia direttamente sulle cellule esfoliate presenti nel campione, che previo inoculo dello stesso in colture cellulari allestite su vetrino ed incubate per 18-24 ore (esame colturale rapido). In parallelo, i campioni sono stati inoculati in colture cellulari per mettere in evidenza la presenza di agente/i citopatogeno/i (esame colturale tradizionale).

Risultati

La valutazione comparativa dei risultati ottenuti mediante la ricerca di proteine virus-specifiche nelle cellule esfoliate del campione o previo esame colturale rapido, come anche di quelli ricavati attraverso l'esame colturale tradizionale, ha messo in evidenza sostanziali differenze nell'efficacia di rilevamento virale, dipendentemente dalla specie virale in causa. In particolare, l'immunofluorescenza applicata al campione, i cui risultati sono disponibili nell'ambito della stessa giornata di arrivo del campione stesso, sembra essere il metodo di scelta per il virus respiratorio sinciziale, che a sua volta rappresenta il virus più frequentemente riscontrato nei campioni clinici e quello maggiormente in causa nelle infezioni nosocomiali, mentre risulta pressoché inefficace per adenovirus e per i virus influenzali e parainflenzali. Per il primo, l'esame colturale tradizionale è quello che garantisce i migliori risultati, mentre per le due ultime categorie di virus, l'esame colturale rapido appare come il metodo di scelta.

Considerazioni conclusive

Una scelta mirata delle indagini virologiche, oltre a garantire un valido supporto per il clinico, può permettere, al contempo, l'attuazione di eventuali misure di profilassi, atte ad evitare l'insorgenza e/o la diffusione di infezioni nosocomiali.

P154**METODI TRADIZIONALI E MOLECOLARI A CONFRONTO NELLA DIAGNOSI DI INFEZIONE VIRALE**

Arcangeletti M.C., De Conto F., Pinardi 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

È stata valutata l'efficacia della microscopia elettronica, dell'esame colturale convenzionale e di metodi molecolari avanzati nella diagnosi delle infezioni virali.

Materiali e Metodi

Le indagini virologiche condotte presso l'Unità di Virologia (Sezione di Microbiologia) di Parma, si riferiscono a 5032 campioni clinici, di cui 2288 feci, 115 urine (per la ricerca di virus BK), 2377 tamponi faringei, 252 liquor, analizzati in un arco di tempo di circa 3 anni, dal gennaio 2001 al febbraio 2004. Tutti i campioni sono stati sottoposti ad esame colturale tradizionale. La microscopia elettronica (ME) è stata impiegata quale metodo rapido direttamente sugli estratti fecali e sui campioni di urina, come anche per l'identifica-

zione degli agenti citopatogeni rivelati mediante esame colturale. Nell'ambito dei 5032 campioni clinici analizzati, 134 campioni di feci, 103 urine e 153 liquor sono stati sottoposti anche a ricerca di acido nucleico virale mediante reazione polimerasica a catena (PCR).

Risultati

L'esame elettromicroscopico utilizzato come mezzo per la diagnosi rapida, è stato in grado di rivelare, entro poche ore dall'arrivo del campione, la presenza di numerosi virus, agenti di enterite, negli estratti fecali, mettendo in evidenza anche doppie infezioni, come la presenza di poliomavirus nei sedimenti urinari. Nell'ambito della diagnosi convenzionale, l'esame colturale ha evidenziato diversi agenti citopatogeni, molti dei quali identificati attraverso ME; tra gli altri, un bunyavirus da liquor. L'utilizzo concomitante di PCR e di ME per la diagnosi rapida ha dimostrato che la prima è stata in grado di rivelare la presenza di virus, attraverso il rilevamento di acidi nucleici virali, in un numero di campioni significativamente maggiore rispetto alla microscopia elettronica.

Considerazioni conclusive

Il confronto tra metodi tradizionali - in particolare microscopia elettronica ed esame colturale - e metodi molecolari quali PCR, rende conto di quanto la scelta fra gli uni e gli altri sia a volte opinabile e di come, in realtà, ognuno di essi fornisca informazioni non sovrapponibili ma complementari al raggiungimento di una esauriente diagnosi di laboratorio.

P155

STUDIO EPIDEMIOLOGICO SULL'INFEZIONE CONGENITA DA CMV E LA SORDITÀ NEUROSENSORIALE IN ITALIA

Barbi M., Binda S., Caroppo M.S., Tanzi M.L., Veronesi L., Germinario C., Calvario A., Bozzi A., Mura I., Piana A., Solinas G.

Istituto di Virologia, Università degli Studi di Milano, Via Pascal 38, 20133 Milano

L'accertamento dell'impatto dell'infezione congenita da Cytomegalovirus (CMV) come causa di disabilità è indispensabile per valutare l'opportunità di adottare strategie preventive. Per raccogliere dati sulla prevalenza dell'infezione congenita in Italia è stato esaminato un campione di 9002 bambini nati in 4 regioni; per ogni neonato è stata effettuata la ricerca del DNA virale sulla Guthrie card allestita alla nascita (DBS test). Il test in questione è di semplice esecuzione, poco costoso e quindi facilmente applicabile su larga scala. Il peso dell'infezione come causa di handicap è stato indagato attraverso l'accertamento del suo ruolo nell'eziologia della sordità neurosensoriale (SNHL). A questo scopo è stato eseguito un follow up audiologico dei neonati con infezione congenita individuati nell'indagine sopra descritta; inoltre è stata effettuata la diagnosi retrospettiva di infezione congenita, tramite analisi delle Guthrie card, in un campione di bambini con SNHL accertata (3 mesi-5 anni). Tra i neonati arruolati sono stati individuati 16 bambini infetti: la prevalenza dell'infezione congenita da CMV è risultata quindi pari all'1,8%. Sia i bambini sintomatici (2) che quelli asintomatici (14) non hanno mostrato segni di danno audiologico né alla nascita né al follow up (16/16 a 6 mesi; 10/16 a 12 mesi e 2/16 a 18 mesi). Le Guthrie card dei 77 bambini con sordità neurosensoriale accertata (> 40 dBHL) sono state recuperate dal Centro Regionale di Screening e saggiate mediante il DBS test: in 19 casi (25%) è stata diagnosticata un'infezione congenita; i bambini in questione erano affetti da sordità

grave o profonda. Si possono quindi trarre le seguenti conclusioni: 1) la prevalenza dell'infezione congenita da CMV in Italia è più bassa di quella stimata in studi precedenti (3-5%); 2) l'infezione congenita sembra essere un'importante causa di SNHL; 3) il DBS test ha giocato un ruolo chiave sia per lo screening che per l'accertamento retrospettivo d'infezione congenita.

P156

CORRELAZIONE TRA CARICA VIRALE ED ESPRESSIONE DEI GENI LITICI DI EBV NEL SANGUE PERIFERICO DI TRAPIANTATI RENALI

Bergallo M., Merlino C., Daniele R., Tarallo S., Margio S., Lapenna A., Negro Ponzì A., Cavallo R.

Dipartimento di Sanità Pubblica e Microbiologia, S.C. Virologia, Università di Torino

Nei pazienti trapiantati renali è descritto un aumentato rischio di disordini linfoproliferativi post-trapianto (PTLD) che consistono in un'ampia gamma di manifestazioni patologiche, dall'iperplasia linfoide ai linfomi. E' ormai riconosciuta una forte correlazione tra l'infezione da EBV, il grado ed il tipo di immunosoppressione e l'insorgenza di PTLD. Recentemente, è stata descritta una correlazione tra l'incidenza di PTLD e la quantità di EBV-DNA, misurata mediante PCR quantitativa, nel sangue periferico di questi pazienti. La valutazione della viremia da EBV sembra, quindi, essere un utile indicatore prognostico del rischio di sviluppare una PTLD.

Dal momento che i nostri studi hanno dimostrato, in accordo con quanto riportato in letteratura, che la carica di EBV-DNA nei linfomonociti presenta un andamento fluttuante e che è assente nel siero di trapiantati renali asintomatici, in questo studio abbiamo valutato in parallelo la carica virale e l'espressione dei geni virali litici nel sangue periferico di questi pazienti, allo scopo di evidenziare l'attivazione dell'infezione litica, ulteriore parametro per la valutazione dei pazienti a rischio di PTLD. La carica di EBV-DNA è stata quantificata nei linfomonociti di 46 trapiantati renali (29 maschi, 17 femmine, età media 51,6 +/- 11,5 anni; mediana del tempo dal trapianto 60 mesi; 21 in terapia con FK506 e 25 in ciclosporina A) mediante PCR quantitativa-competitiva messa a punto nel nostro laboratorio, mentre gli RNA messaggeri (mRNA) relativi ai geni litici (BZLF-1; BALF-2; BcLF-1) sono stati determinati mediante nested RT-PCR da noi sviluppata.

P157

SVILUPPO DI UNA PCR QUANTITATIVA COMPETITIVA PER LA VALUTAZIONE DELLA CARICA VIRALE DELL'EBV

Bergallo M., Merlino C., Daniele R., Sidoti F., Mantovani S., Negro Ponzì A., Cavallo R.

Dipartimento di Sanità Pubblica e Microbiologia, S.C. Virologia, Università di Torino

I disordini linfoproliferativi post-trapianto (PTLD) rappresentano una grave complicanza che può verificarsi nei portatori di trapianto d'organo. E' stata descritta una correlazione tra l'infezione da EBV, il grado ed il tipo di immunosoppressione e l'insorgenza di PTLD. Poiché l'EBV è caratterizzato