

**Università degli Studi del Piemonte Orientale  
“Amedeo Avogadro”**



**Dottorato di Ricerca  
in  
Medicina Molecolare  
*Ciclo XXII***

**Relazione 2° anno**

**TITOLO:**

**INDAGINE SULLA TRASMISSIONE VERTICALE DELL'INFEZIONE  
DA POLYOMAVIRUS UMANI E DI SV-40 MEDIANTE METODICHE  
MOLECOLARI ED IMMUNOLOGICHE.**

Candidato: Allegrini Sara

*Tutor:* Prof. Boldorini Renzo

## SEZIONE 1

### RISULTATI SCIENTIFICI

#### INTRODUZIONE

I Polyomavirus (PVs) umani sono virus altamente diffusi nella popolazione mondiale sia adulta che infantile (1) e rivestono un ruolo fondamentale nella patogenesi di alcune importanti patologie a carico di pazienti immunocompromessi, come la Leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML) in pazienti con AIDS, la Cistite Emorragica in pazienti trapiantati di midollo osseo o la Nefropatia Associata a Polyomavirus (PVAN) in trapiantati renali (2,3,4,5).

A tutt'oggi molti aspetti dell'infezione umana da parte di questi virus rimangono da chiarire; uno degli aspetti più controversi risulta essere la modalità di trasmissione con cui i PVs si diffondono nella popolazione umana, in quanto l'infezione primaria ad essa associata non presenta una fase acuta chiaramente riconoscibile (6).

Approfondire le conoscenze su un aspetto sicuramente importante della storia naturale dei PVs umani, come le loro modalità di trasmissione, risulta critico per poter comprendere al meglio la patogenesi delle importanti patologie umane di cui rappresentano il principale agente etiologico e per poter approntare una efficace terapia e prevenzione.

#### **I Polyomavirus**

I Polyomavirus (PVs) appartengono, secondo una recente classificazione, alla famiglia delle *Polyomaviridae*, anche se storicamente venivano classificati come genere appartenente, assieme a quello dei *Papillomavirus*, alla famiglia delle *Papovaviridae* (6). L'infezione virale può avvenire in forma *litica* –con distruzione della cellula bersaglio e liberazione della progenie virale– o *abortiva* –cioè con espressione parziale delle proteine virali, in assenza di distruzione cellulare– con potenzialità di trasformazione oncogenica in vari tipi cellulari (infatti il loro nome deriva dalla fusione di “Poly” e “oma” proprio a sottolineare questa loro caratteristica (7). Attualmente sono noti diversi PVs in grado di infettare su larga scala molte specie tra i mammiferi in modo relativamente specie-specifico tra cui topo, criceto, scimmia e anche l'uomo.

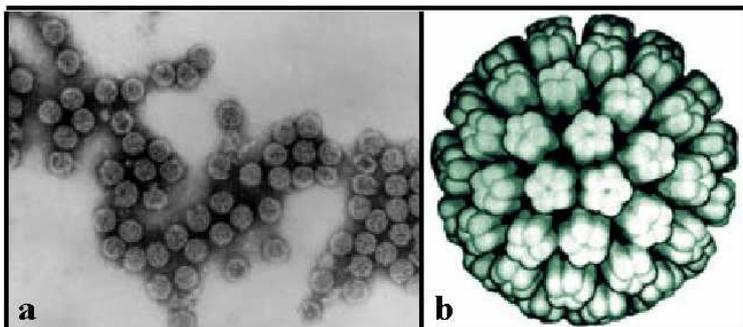
L'uomo è l'ospite naturale di due PVs: il Polyomavirus hominis 1 e 2, meglio conosciuti con l'acronimo, rispettivamente, di BK virus (BKV) e di JC virus (JCV) derivante dalle iniziali dei pazienti in cui sono stati isolati per la prima volta nel 1971. BKV è stato isolato per la prima volta nelle urine di un paziente con trapianto renale che aveva sviluppato nel periodo post-operatorio una stenosi ureterale (8). Mentre JCV è stato isolato partendo da oligodendrociti (cellule del sistema

nervoso centrale produttrici di mielina) di un paziente con morbo di Hodgkin in terapia immunosoppressiva, che aveva sviluppato Leucoencefalopatia Multifocale Progressiva (PML) (9), una patologia fatale del sistema nervoso centrale caratterizzata da demielinizzazione sottocorticale, multifocale della sostanza bianca talora estesa alla sostanza grigia cerebrale, che si manifesta in un contesto di immunodeficienza (10).

Il Simian virus 40 (SV-40) è uno dei virus più studiati, di cui si conosce sia l'intero genoma, sia il suo modo di interagire con la cellula ospite; sebbene il suo ospite naturale sia rappresentato dalle scimmie, SV-40 può infettare anche l'uomo. Sembra sia stato introdotto accidentalmente nell'uomo tramite la somministrazione di vaccini antipoliomielite contaminati tra il 1955 e il 1963 (il vaccino veniva allestito in colture di cellule renali di scimmia in cui il virus era presente come contaminante) e una volta nell'uomo sia stato poi in grado di infettare nuovi individui (11).

Mentre per BKV e JCV è stato ormai accertato il loro ruolo in diverse patologie umane, per quanto riguarda SV-40 sono ancora in corso studi; osservazioni epidemiologiche su popolazioni accidentalmente infettate da vaccini antipoliomielite non hanno evidenziato apparenti legami tra la presenza del virus e l'insorgere di specifiche patologie. Recenti osservazioni hanno ipotizzato che esso possa prendere parte al processo di cancerogenesi umana specie per ciò che riguarda l'insorgenza di mesoteliomi maligni (12,13).

Strutturalmente i PVs (vedi **figura 1**) presentano un capsido a simmetria icosaedrica delle dimensioni di 40-45 nm, privo di envelope, formato da 3 tipi di proteine: viral protein 1 (VP1), viral protein 2 (VP2) e viral protein 3 (VP3). VP1 rappresenta la proteina capsidica maggiore in quanto da sola costituisce circa l'80% dell'intero capsido; essa si associa in 72 pentameri che costituiscono l'intera superficie esterna del capsido, e pertanto è la diretta responsabile dell'interazione con le molecole di superficie della cellula bersaglio. VP2 e VP3 invece costituiscono insieme il restante 20% del capsido associandosi tra loro in complessi che ne formano la superficie interna (14).

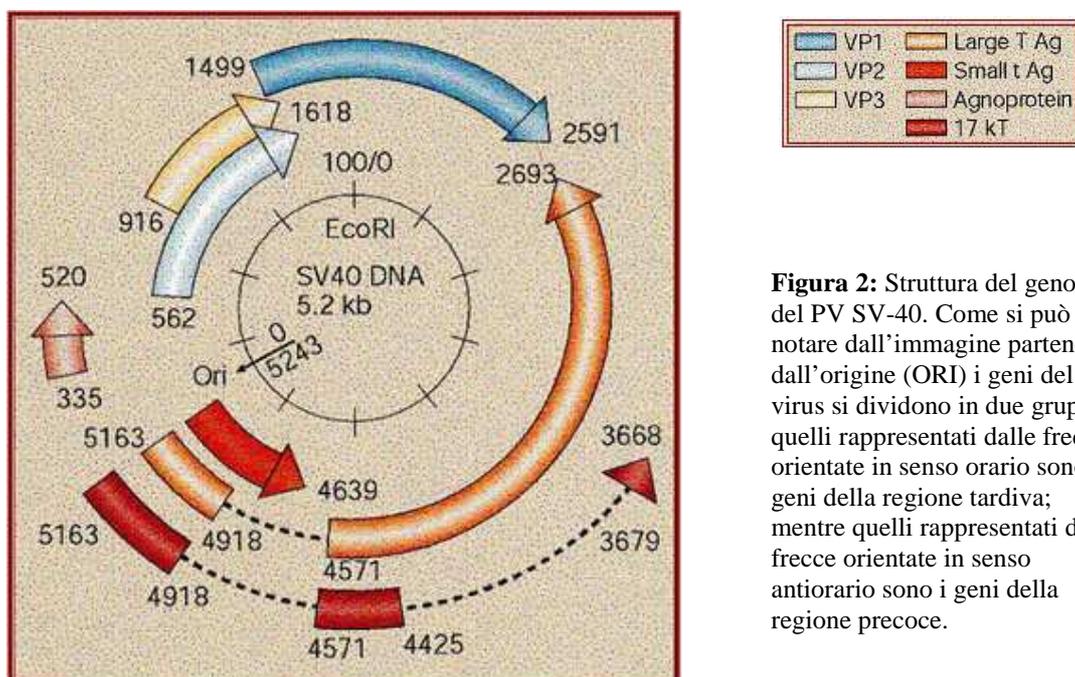


**Figura 1:** a) fotografia al microscopio elettronico del PV di scimmia SV-40 (Ingrandimento 10000); b) rappresentazione grafica 3D della struttura esterna dei PV rappresentata dall'envelope formato nello strato esterno solo dalla VP1.

Il genoma virale dei PVs consiste in una singola molecola di DNA, a doppio filamento, delle dimensioni di circa 5300 paia di basi (bp), che si trova all'interno del capsid associata con quattro istoni (H2A, H2B, H3 e H4) provenienti dalla cellula eucariotica infettata; il DNA e gli istoni sono complessati sotto forma di cromatina a costituire quello che spesso viene definito un minicromosoma virale. Il genoma dei tre PVs precedentemente citati (BKV, JCV ed SV40) presenta una elevata omologia di sequenza (i PVs umani hanno una omologia del 75%, mentre se li confrontiamo con SV40 scende al 70%) ad indicare una comune origine nell'evoluzione (13,14).

Funzionalmente il genoma dei PVs (vedi **figura 2**) viene suddiviso in tre regioni:

- La **regione precoce** (Early region, nota anche come regione LT) di 2400bp, che codifica due proteine non strutturali: una fosfoproteina nucleare definita "**large tumor (T) antigen**" (**TAg**) e una proteina citoplasmatica ricca in cisteine, definita "**small tumor (t) antigen**" (**tAg**). Tali proteine sono le prime ad essere espresse durante l'ingresso del virus nella cellula e sono perciò indicative della presenza virale. TAg riveste un ruolo critico nel ciclo replicativo del virus in quanto contribuisce attivamente alla sua regolazione; infatti promuove la progressione nel ciclo cellulare della cellula ospite inducendo l'entrata in fase S, contribuisce al reclutamento del macchinario replicativo di cui il virus è sprovvisto, prende parte attivamente alla replicazione del DNA come fattore di iniziazione del processo di sintesi e come elicasi. TAg svolge inoltre un importante ruolo nello sviluppo di neoplasie in animali da laboratorio, attraverso l'interazione con svariate proteine cellulari che ricoprono il ruolo di importanti oncosoppressori o regolatori del ciclo cellulare, tra cui la proteina 53 (p53) e la proteina associata al retinoblastoma (pRb). Il ruolo di tag invece è poco noto, sembra svolgere un'attività di supporto nei confronti di TAg (14).



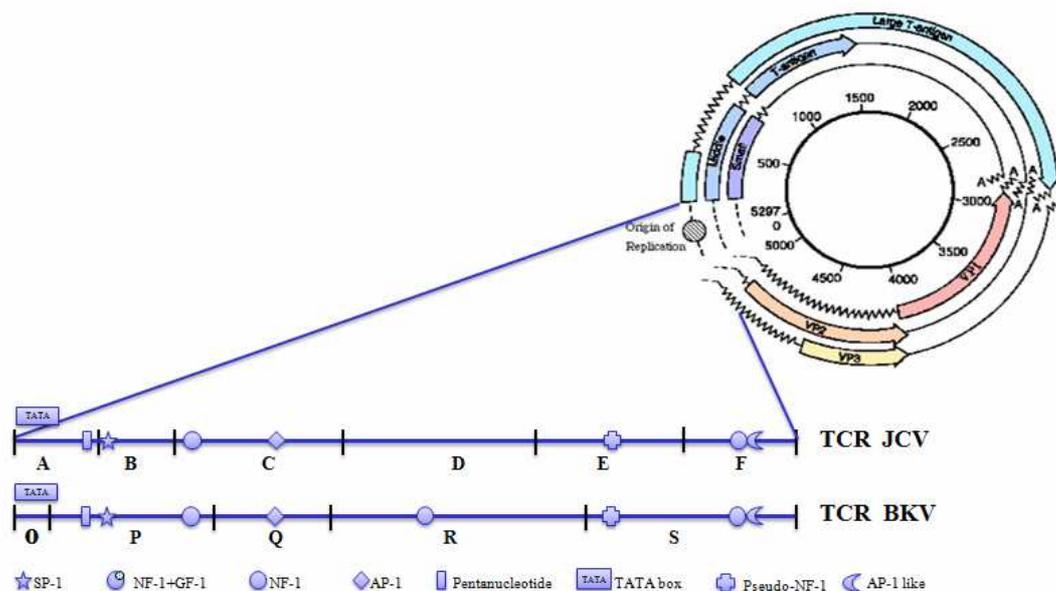
**Figura 2:** Struttura del genoma del PV SV-40. Come si può notare dall'immagine partendo dall'origine (ORI) i geni del virus si dividono in due gruppi: quelli rappresentati dalle frecce orientate in senso orario sono i geni della regione tardiva; mentre quelli rappresentati dalle frecce orientate in senso antiorario sono i geni della regione precoce.

- La **regione tardiva** (Late region) di 2300 bp, che viene espressa efficacemente solo durante la replicazione virale, codifica per le proteine capsidiche del virus **VP1**, **VP2** e **VP3** e per la proteina a funzione ignota, definita appunto, **agnoproteina** (tale proteina sembra svolgere un ruolo nell'assemblaggio del virione prima del suo rilascio all'esterno della cellula) (7,13). Queste due regioni genomiche, codificanti, sono, dal punto di vista genomico stabili, ovvero le mutazioni nella sequenza di basi nucleotidiche che le compongono sono rare e generalmente coinvolgono singole basi (14). E' possibile identificare diversi sottotipi di JCV e BKV basandosi sulle variazioni della regione codificante per la VP1 (la relativa variabilità di questa porzione della regione tardiva è da imputare al ruolo di VP1 nel riconoscere le diverse cellule bersaglio tramite interazioni con recettore di membrana) (13). Attualmente JCV viene suddiviso in 8 genotipi (definiti **tipo 1**, **tipo 2**, **tipo 3**, **tipo 4**, **tipo 5**, **tipo 6**, **tipo 7**, **tipo 8**) che a loro volta vengono suddivisi in numerosi sottotipi (15). Analogamente anche BKV è stato diviso in quattro genotipi denominati **gruppo I**, **gruppo II**, **gruppo III** e **gruppo IV** (16); i genotipi così identificati di BKV corrispondono ai sierotipi identificabili nelle diverse popolazioni (il concetto di sierotipo riflette la risposta immune specifica dell'ospite verso epitopi antigenici di differenti strutture), mentre per quanto riguarda JCV questa sovrapposizione di classificazione non è possibile in quanto la regione tardiva del suo genoma non mostra una variazione di sequenza sufficiente a generare epitopi antigenici sierologicamente distinguibili (17).

- La **regione di controllo trascrizionale** (TCR region) di circa 400 bp, non codificante, è posta tra la regione precoce e quella tardiva, e svolge un importante ruolo nel controllo della regolazione della sintesi e della replicazione virale. Contiene le **origini di replicazione (ORI)** e gli elementi di **promoter/enhancer** di entrambe le regioni codificanti, permettendo la trascrizione dei geni precoci su uno dei filamenti in una direzione, e quella dei geni tardivi sul filamento complementare in direzione opposta (18). All'interno di questa regione sono anche presenti siti di legame per diversi fattori trascrizionali, tra i quali i più importanti sono: **Sp1** proteina endogena dell'ospite coinvolta nel differenziamento cellulare, il cui ruolo principale sembra essere quello di mantenere libere da metilazione le isole CpG mantenendo così attiva la trascrizione; **Nuclear factor 1 (NF1)** proteina dell'ospite che media le reazioni infiammatorie ed immunologiche in risposta a vari stimoli, mutazioni a questo livello sembrano interferire con la trascrizione dei geni tardivi; **TAg** proteina di origine virale che agisce attraverso un meccanismo di controllo negativo, infatti inibisce l'attività del promotore precoce; **Puro $\alpha$**  proteina che controlla la replicazione e la trascrizione del DNA, in particolare promuove la trascrizione dei geni precoci e viene inibita da TAg (19). La regione TCR, a differenza di quelle precedenti, è caratterizzata da una ipervariabilità

mutazionale dovuta a inserzioni di singoli o molteplici nucleotidi, duplicazioni o delezioni. In contrasto con quanto appena detto sono state trovate un limitato numero di sequenze di TCR altamente conservate definite *archetipi*; queste sequenze rappresentano i genotipi dei PVs realmente circolanti nella popolazione umana e derivano dalla co-evoluzione con l'ospite (prova di ciò ne è il fatto che è possibile usare JCV come marker per ricostruire le migrazioni umane). L'ipotesi è che dalle sequenze archetipo presenti in un individuo si originano le sequenze ricombinanti a causa della ipervariabilità della regione, allo scopo di adattarsi alle condizioni presenti nell'ospite modificando il tropismo cellulare, il potere infettivo, l'aggressività e l'abilità replicativa virale (20). Infatti la regione regolatoria sembra controllare la trascrizione cellulo-specifica del DNA virale come è stato osservato negli studi di Sock et al. (21) dove è emerso che la TCR di JCV aumenta notevolmente la trascrizione nelle cellule gliali in coltura in confronto alle cellule non gliali; inoltre, in altri studi è stato osservato che le sequenze riarrangiate mostrano un'attività differente da quelle archetipo, che può essere sia più alta sia più bassa (22). Allo scopo di classificare più agevolmente i genotipi di JCV, *Ault e Stoner* (23) (vedi **figura 3**) divisero arbitrariamente la sequenza archetipo individuata da *Yogo et al.*(24), definita Mad1, in cinque blocchi definiti **A**(25bp), **B**(23bp), **C**(55bp), **D**(66bp), **E** (18bp) e **F**(69bp) in base alle sequenze che mancavano o duplicavano se confrontate con altri archetipi .

Analogamente anche la regione TCR di BKV fu divisa in cinque blocchi di sequenza definiti da *Yoshiike e Takemoto* (25) **O**(124bp), **P**(68bp), **Q**(39bp), **R**(63bp) ed **S**(63bp), basandosi su una sequenza archetipo (BKV-WW) .



**Figura 3:** Divisione in blocchi di sequenza della regione regolatoria (TCR) in base al legame di fattori trascrizionale della cellula ospite, rispettivamente di JCV e di BKV.

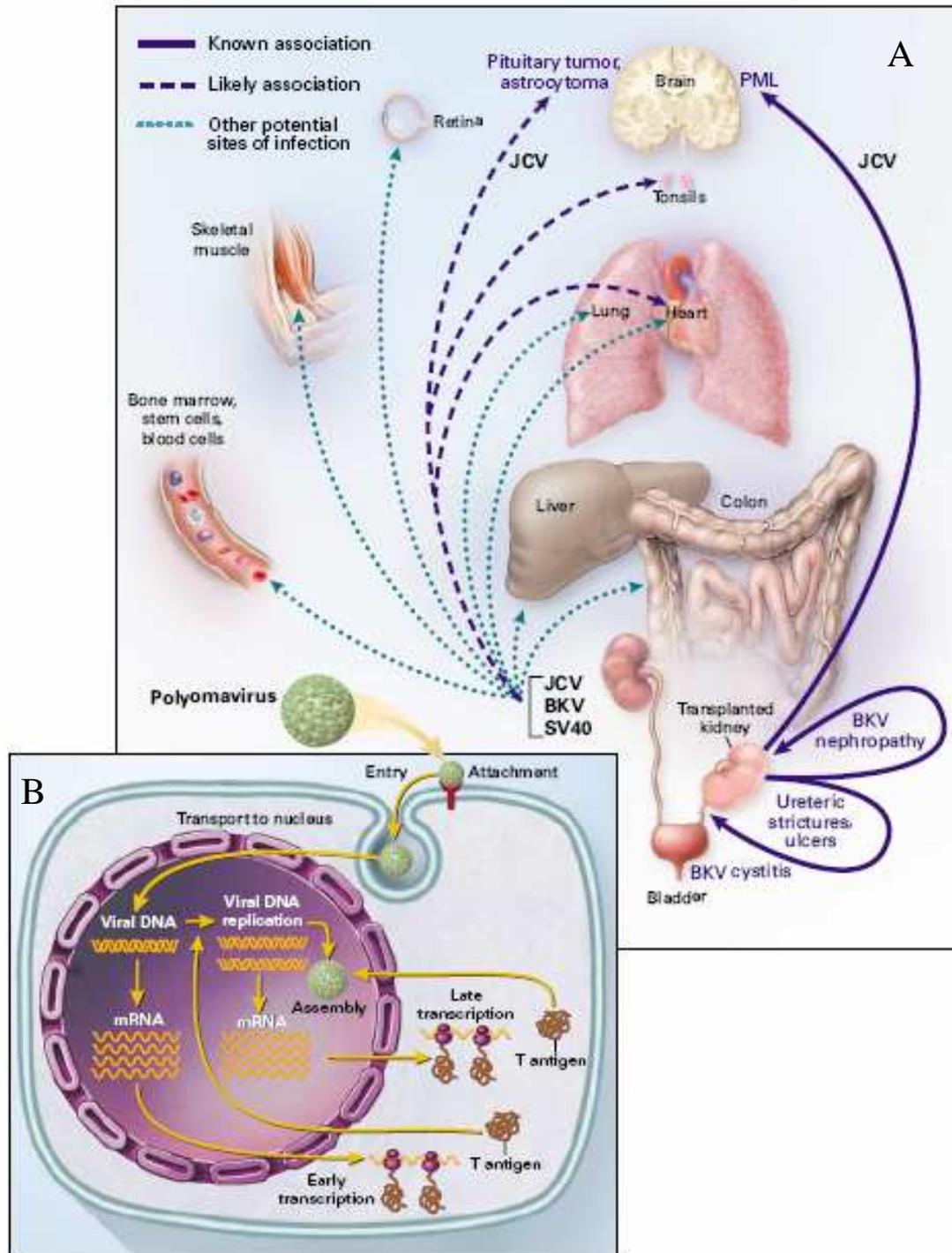
I PVs umani sono virus ubiquitari; infatti circa il 60-80% degli adulti possiede anticorpi della classe IgG diretti contro BKV e JCV (1). Si ritiene che l'infezione primaria avvenga durante l'infanzia e decorra in forma asintomatica od oligosintomatica (blande infezioni a livello respiratorio con disturbi per lo più simil-influenzali), autolimitante. Successivamente il virus rimane latente riattivandosi in seguito a immunodepressione, soprattutto se dovuta ad un deficit di linfociti T.

La patogenesi dell'infezione da PVs non è stata ancora definitivamente chiarita. L'ipotesi più probabile prevede una trasmissione per via aerea (26), la successiva moltiplicazione a livello dell'apparato respiratorio con conseguente viremia transitoria. Per via ematogena, veicolato dai linfociti T, il virus raggiunge vari siti di latenza attualmente identificati in oligodendrociti del sistema nervoso centrale, cellule tubulari renali, urotelio (1), tessuto stromale tonsillare, linfociti B e loro precursori (26).

I virus aderiscono alla membrana citoplasmatica della cellula ospite tramite la proteina capsidica VP1 (27), vengono internalizzati mediante vescicole endocitotiche e quindi trasportati al nucleo dove, previa fusione delle vescicole alla membrana nucleare, sono liberati nelle cisterne perinucleari (vedi **figura 4**). La sintesi del DNA virale necessita dei prodotti trascritti nella fase precoce, in particolare del TAg, che funziona da attivatore trascrizionale ed è richiesto per il completamento del ciclo replicativo del virus e per iniziare la trascrizione dei geni tardivi. In particolare, una volta privato di rivestimento capsidico, il virus inizia la trascrizione degli RNA messaggeri della regione precoce ad opera della RNA polimerasi dell'ospite; i trascritti vengono tradotti nel citoplasma. La trascrizione della regione tardiva consente la produzione delle proteine che entreranno a far parte del capsido ed assumeranno pertanto il ruolo di determinanti antigenici. Le particelle virali, una volta assemblate nel nucleo, liseranno la cellula ospite acquisendo la capacità di iniziare un nuovo ciclo infettivo.

L'infezione della cellula può essere di due tipi:

- Infezione **produttiva o litica** nelle cellule permissive, con formazione di particelle virali complete a cui consegue la morte cellulare e la liberazione di particelle virali infettanti.
- Infezione **abortiva o non produttiva** nelle cellule non permissive: si suppone che Tag si leghi a proteine cellulari, come quelle prodotte dai geni onco-soppressori quali p53 e pRB (28) che vengono inattivate. Solitamente questo effetto si manifesta per pochi giorni, dopodichè il genoma virale viene rilasciato dalla cellula che ritorna a possedere le caratteristiche normali.



**Figura 4:** **A)** Principali siti di latenza noti dei PVs umani, JCV e BKV, e di SV-40 all'interno dell'organismo umano. **B)** Ciclo replicativo dei PVs. FASE 1 Il virus interagisce con i recettori di membrana della cellula ospite; FASE 2 in seguito all'interazione tra il virus e il recettore di membrana inizia il processo endocitico con cui il virus penetra nella cellula ospite; FASE 3 il virus ormai all'interno della cellula si dirige verso il nucleo; FASE 4 il virus interagisce con i fattori trascrizionali endogeni per poter iniziare la fase di trascrizione genica; FASE 5 l'mRNA virale prodotto migra nel citosol; FASE 6 le proteine virali generate nel citosol tornano nel nucleo della cellula ospite; FASE 7 nel nucleo le proteine virali possono o far partire un nuova fase replicativa del genoma virale (FASE 8 e 9) oppure riassemblarsi intorno alla molecola di dsDNA virale per generare nuovi virioni (FASE 10), che attraverso la via escitica vengono liberati nell'ambiente esterno (FASE 11,12 e 13).

A volte il genoma virale può integrarsi in modo casuale nel DNA della cellula ospite che assume caratteri trasformati. Tale processo sembra essere coinvolto nell'insorgenza delle neoplasie. L'integrazione del genoma virale potrebbe inoltre provocare la comparsa sulla superficie cellulare di antigeni virali, riconosciuti dal sistema immunitario con conseguente danno cellulare immunomediato (per reazione crociata) ed essere quindi causa di malattie autoimmunitarie (sclerosi multipla, lupus eritematoso sistemico, artrite reumatoide).

Come già accennato l'infezione primaria può decorrere in forma asintomatica o esordire con lieve sintomatologia delle prime vie aeree. Generalmente negli individui immunocompetenti BKV e JCV non causano quadri clinici di significato patologico ed una riattivazione virale si può occasionalmente riscontrare, mediante citologia urinaria, durante la gravidanza, negli anziani, nei pazienti affetti da neoplasie e trattati con chemioterapia, nei diabetici, nei soggetti dializzati (29).

Le manifestazioni cliniche da PVs si riscontrano prevalentemente nei pazienti affetti da deficit dell'immunità cellulo-mediata, in particolare a carico dei linfociti T, come avviene in corso di AIDS (2,3), di trapianto allogenico di midollo osseo (4) e di trapianto renale (5).

Allo stato attuale delle conoscenze possiamo affermare che JCV sia sicuramente l'agente eziologico della PML (30), mentre BKV è attualmente riconosciuto come agente eziologico delle cistiti emorragiche in pazienti riceventi trapianto di midollo osseo eterologo (31) e della cosiddetta nefropatia da PVs che colpisce una piccola percentuale di pazienti portatori di trapianto renale.

Nonostante il largo numero di studi effettuati, specie recentemente, sussistono ancora alcuni dubbi su vari aspetti della storia naturale dell'infezione virale, sulle modalità di trasmissione dell'infezione e infine su siti di latenza virale, oltre a quelli già noti del sistema nervoso centrale e dell'apparato uropoietico.

### **Le possibili vie di trasmissione dell'infezione da PVs umani**

La modalità con cui i PVs si diffondono all'interno della specie ospite rimane, di sicuro, uno degli aspetti più oscuri e di difficile studio della loro storia naturale, non solo per quanto riguarda i PVs umani, ma anche per i PVs infettanti altre specie come il Polyomavirus murino (*Murine Polyoma virus* (MuPyV(33) o SV-40(34)). Per quanto riguarda le possibili vie di trasmissione dei PVs umani BKV e JCV sono state fatte varie ipotesi:

- **Trasmissione per via aerea:** dato che l'infezione primaria dei PVs sembra avvenire a livello delle vie respiratorie superiori, si ipotizza che individui infettati in forma asintomatica possano rilasciare nell'ambiente le particelle virali tramite fini gocce di aerosol, oppure tramite gocce di saliva. A conferma di questa ipotesi sono stati riportati casi in cui sono stati isolati i virus

partendo da lavaggi e spazzolati provenienti della gola di individui immunocompromessi (35), e soprattutto nel tessuto tonsillare di bambini con ricorrenti patologie respiratorie (36). Si deve però aggiungere che, nonostante sia stato individuato il DNA virale, non è stato possibile dimostrare l'infettività dei virus isolati transfettandoli in linee cellulari suscettibili.

- **Trasmissione urinaria:** è noto da studi effettuati su campioni autoptici e chirurgici che rene e vie escrettrici urinarie rappresentano importanti siti di latenza di JCV e BKV e alcuni studi rilevano un aumento della viruria di BKV e JCV in condizioni di deficit immunologici transitori o persistenti (37,38). E' stato perciò ipotizzato che una delle vie con cui le particelle virali vengano propagate e trasmesse da individuo ad individuo sia tramite la loro escrezione nelle urine (39).
- **Trasmissione oro-fecale:** alcuni studi hanno messo in evidenza la possibilità che i PVs possano utilizzare come sito d'entrata il tratto gastrointestinale tramite l'ingestione di cibi e acqua contaminati. Questa ipotesi viene supportata dal ritrovamento dei genomi virali in tessuti provenienti dall'apparato gastrointestinale (35). Inoltre è stato recentemente riportato che è stato possibile individuare DNA di BKV analizzando il materiale proveniente dai rifiuti urbani in concentrazioni relativamente elevate ( $10^1$ - $10^3$  particelle virali per 4 ml di rifiuti)(40).
- **Trasmissione tramite organo trapiantato:** costituisce una possibile via di trasmissione nell'eventualità in cui si trapianti un organo di latenza per i PVs, come per esempio il rene, da un individuo sieropositivo ad uno sieronegativo (41).
- **Trasmissione verticale:** quest'ultima via di trasmissione è stata proposta da alcuni autori sulla base di osservazioni epidemiologiche che evidenziano sia la presenza di IgG anti JCV e BKV nel sangue di soggetti in età pediatrica (42), sia la presenza di materiale genomico di SV-40 all'interno di tumori pediatrici (43). In particolare è stata proposta la **trasmissione per via trans-placentare**, anche se non si esclude la possibilità di trasmissione nel periodo perinatale. L'ipotesi della trasmissione trans-placentare viene supportata sia da studi epidemiologici, che hanno messo in evidenza la presenza di IgG anti JCV e BKV nel sangue di cordone ombelicale in neonati sani (44), sia da studi sperimentali effettuati sulla possibilità di trasmissione trans-placentare di un analogo Polyomavirus nel topo (*Murine Polyoma virus* (MuPyV) (33) dimostranti il passaggio di virioni attraverso il cordone ombelicale durante l'infezione virale acuta. Tale ipotesi viene, inoltre, supportata dall'osservazione che durante la gravidanza, verosimilmente in seguito a mutate condizioni immunologiche ed ormonali, si evidenzia con discreta frequenza una riattivazione dell'infezione da PVs (45). Ciò è dimostrato dalla escrezione urinaria delle cosiddette decoy cells, cellule uroteliali con tipiche inclusioni intranucleari, espressione morfologica di proliferazione virale. Altri autori tuttavia, basandosi sull'utilizzo di metodiche molecolari, non sono riusciti a

dimostrare con certezza la possibilità di una significativa trasmissione trans-placentare dell'infezione (46,47), pertanto tale modalità di trasmissione è tuttora controversa.

Lo studio da noi condotto (48) durante il primo anno di dottorato, su di una popolazione non selezionata di 300 donne in stato avanzato di gravidanza (37° settimana di gestazione), sembra confermare i risultati riportati dal secondo gruppo di autori; durante questo studio, infatti è emerso come la riattivazione dei PVs, durante la fase avanzata della gravidanza, sia un evento estremamente infrequente. In base ai risultati riportati in letteratura e da noi ottenuti, non si può escludere la possibilità che tale riattivazione avvenga in altri periodi gestazionali consentendo così il passaggio dei virioni tramite la barriera trans-placentare.

## **SCOPO DEL LAVORO**

Lo studio si propone di verificare ed approfondire la frequenza di infezione/riattivazione dei Polyomavirus umani e di SV-40 in una popolazione non selezionata di 100 donne con gravidanza fisiologica e patologica e l'eventuale trasmissione transplacentare dell'infezione stessa estendendo l'analisi all'intero periodo gestazionale e al periodo perinatale. Durante questo studio verranno utilizzate metodiche molecolari (nested-PCR e quantitative-PCR) per la ricerca e la eventuale quantificazione di genoma virale su campioni di sangue e di urina materni e su campioni di sangue provenienti dal cordone ombelicale dei neonati. Tali metodiche verranno inoltre eseguite su campioni di sangue, di secrezioni delle prime vie aeree del neonato (prelevate con tampone) e, ove possibile, su di campioni di urina appartenenti ai rispettivi neonati. Su tutti i campioni di sangue verranno inoltre utilizzate metodiche di diagnostica immunologica (ELISA) per la determinazione di immunoglobuline dirette contro specifici antigeni virali.

## **MATERIALI E METODI**

### **Raccolta campioni**

Lo studio è stato strutturalmente suddiviso in due fasi: una prima fase volta a chiarire la possibile trasmissione materno-fetale dei PVs, ed una seconda fase incentrata sulla possibile trasmissione durante il periodo perinatale dei relativi neonati.

La prima fase verrà condotta su una popolazione non selezionata di 100 donne con gravidanza fisiologica e patologica, arruolate presso la I Divisione di Ginecologia e Ostetricia dell'Ospedale Maggiore della Carità di Novara. Durante questa prima fase verranno raccolti e analizzati:

- i campioni di urina e di sangue periferico materni prelevati di routine durante i normali controlli ambulatoriali periodici (primo, secondo e terzo trimestre di gravidanza);
- i campioni di sangue di cordone ombelicale dei relativi neonati, raccolti durante il parto e conservati presso il Servizio Trasfusionale dell'Ospedale Maggiore della Carità di Novara, per la normale determinazione del gruppo sanguigno fetale.

La seconda fase, invece, verrà condotta sulla popolazione di neonati nati presso la I Divisione di Ginecologia e Ostetricia dell'Ospedale Maggiore della Carità di Novara, le cui madri sono state arruolate nello studio durante la prima fase. Durante questa seconda fase verranno raccolti e analizzati i campioni di sangue periferico, di secrezioni delle prime vie aeree (prelevate con tampone) e, quando possibile, di urina dei neonati, durante le normali visite di controllo nei primi giorni di vita e a distanza di un mese, durante il controllo ecografico di routine delle anche, presso il reparto di Pediatria dell'Ospedale Maggiore della Carità di Novara .

Lo studio è stato approvato in data 16/05/2008 dal Comitato Etico dell'Ospedale Maggiore della Carità di Novara (provvedimento registro generale numero 1054). Lo studio inoltre prevede l'arruolamento dei soggetti in seguito alla raccolta del consenso informato; data la tipologia dello studio sono stati approntati due distinti consensi informati: uno relativo alla prima fase di studio e uno relativo alla seconda.

Dal 16/05/2008 ad oggi sono state arruolate nello studio 27 donne gravide (range di età 21-36 anni; media 28.9; mediana 28), di cui 25 in corso di gravidanza mentre 2 donne sono andate incontro ad aborto: una ha avuto un aborto spontaneo durante il primo trimestre, mentre l'altra ha abortito durante il secondo trimestre a causa di grave IUGR (Ritardo di Crescita Intra-Uterino) e preclampsia. Delle restanti 25 gravidanze, 22 presentano decorso fisiologico, mentre 3 presentano

gravidanze a carattere patologico (vedi **tabella 1**). Attualmente sono stati raccolti 39 campioni di urina e altrettanti campioni di sangue periferico, in quanto delle 25 gravidanze in corso di studio 14 sono al secondo trimestre di gestazione e 11 al primo trimestre.

Paziente n°	Stato Gravidanza	Patologia
12	II trimestre	Ipertensione
13	Aborto II trimestre	Grave IUGR, preclampsia
17	II trimestre	Epatopatia da steatosi, trombosi vena ovarica destra
24	I trimestre	piastrinopenia

**Tabella 1:** Dati relativi alle gravidanze patologiche arruolate fino ad oggi nello studio.

## **Processazione del materiale raccolto**

### **Campioni di urina**

I campioni di urina sono stati centrifugati a 2500 giri per minuto (rpm), per 10 minuti, in modo da poter concentrare le cellule presenti nel campione, che altrimenti risulterebbero troppo diluite per la ricerca dei PVs, senza che vadano incontro a rottura. Per quanto riguarda i campioni materni, parte del sedimento cellulare è stato raccolto in una provetta da 1,5 mL e conservato a -20°C per la ricerca di genoma virale tramite saggio PCR. La restante parte del sedimento è stata, invece, sottoposta ad analisi citologica, previo allestimento del preparato su vetrino per microscopia, tramite ulteriore centrifugazione a 1,800 rpm, per 10 minuti, mediante Cytospin, fissazione con Cytospray e colorazione tramite metodica di Papanicolau.

Per quanto riguarda, invece, il sedimento cellulare ottenuto partendo da campioni di urina di neonato, esso verrà interamente raccolto e conservato per l'analisi molecolare, dato che l'esigua quantità non consentirebbe in ogni caso l'analisi citologica.

### **Campioni di sangue**

I campioni di sangue sono stati raccolti e centrifugati a 2500 rpm, per 10 min, per consentire la separazione del siero ed evitare la lisi cellulare. Il siero così ottenuto è stato aliquotato in provette da 1,5 mL e conservato a -20°C. Una parte è stata utilizzata per la ricerca di immunoglobuline anti-PVs mediante saggio ELISA, la restante parte è stata sottoposta ad estrazione del DNA per consentire la successiva analisi molecolare mediante saggio PCR. Per

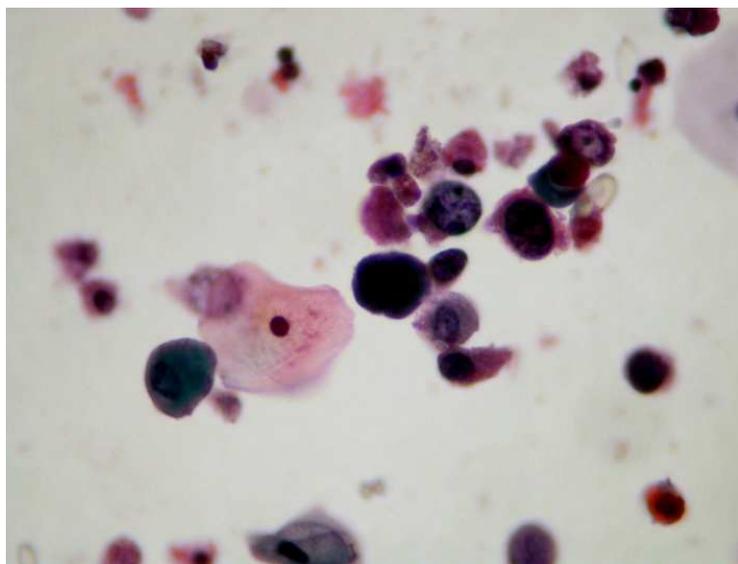
l'estrazione del DNA è stato utilizzato il kit commerciale Genomic DNA from Tissue, NucleoSpin® (Machery-Nagel, Germania) partendo da un volume iniziale di 200 µL di siero. Il kit permette l'estrazione del DNA mediante l'utilizzo di colonne con membrana di silice ad alta affinità per il DNA, in seguito a digestione del campione mediante buffer di lisi e proteasi K. E' stato ottenuto un volume finale di eluizione di 70 µL che verrà sottoposto ad analisi molecolare e conservato a -20°C.

### **Campioni di secrezioni salivari**

Le secrezioni salivari dei neonati saranno prelevate tramite tampone oro-faringeo e lasciate essiccare per permettere la successiva estrazione del DNA mediante il kit commerciale Genomic DNA from Tissue, NucleoSpin® (Machery-Nagel, Germania), utilizzato anche per l'estrazione di DNA a partire da siero. In questo caso sarà necessario aggiungere un passaggio iniziale per permettere la risospensione del materiale salivare; in particolare la parte terminale del tampone sarà stata staccata dal supporto e raccolta in una provetta da 2 mL, nella quale verranno aggiunti 600 µL di PBS.

### **Analisi Citologica**

I campioni di urina, preparati come riportato sopra, sono stati sottoposti ad analisi citologica allo scopo di identificare la presenza di decoy cells, cellule uroteliali atipiche derivanti dal normale sfaldamento dell'epitelio delle vie escrettrici, caratterizzate da specifici aspetti morfologici identificabili mediante microscopia ottica. La presenza di decoy cells all'interno dei campioni di urina risulta essere indicativa di attiva replicazione dei PVs a livello dell'apparato uropoietico. Brevemente, si tratta di cellule epiteliali con nuclei ingranditi, a profilo tondeggiante, con inclusioni intranucleari, che all'indagine ultrastrutturale risultano costituite da numerosissime particelle virali complete (49).



**Figura 5:** Esame citologico delle urine: esempio di decoy cells identificabili dalla presenza di nuclei perfettamente rotondi, con cromatina "a vetro smerigliato". Colorazione di Papanicolaou, ingrandimento originale 250X

## Analisi Molecolare

### Saggio nested PCR multiplex

Su DNA estratto a partire da campioni di siero e di secrezioni salivari e direttamente sui campioni di urina (senza previa estrazione di DNA come proposto da Agostini et al. (50)), viene eseguita una nPCR multiplex, allo scopo di ricercare la presenza di genoma virale appartenente ai PVs umani, JCV e BKV, e di SV-40 amplificando la regione LT. E' stata scelta questa specifica regione del genoma virale dei PVs dato che risulta essere la più conservata. L'amplificazione avviene utilizzando i seguenti primers:

- PM1+ e PM1- primers esterni che amplificano un frammento di DNA *comune* a tutti i PVs (lunghezza del frammento amplificato: 550 bp);
- PM2- primer interno comune a tutti i PVs seguito da: a) JC+ amplifica un frammento di 189 bp specifico per JCV; b) BK+ amplifica un frammento di 353 bp, specifico per BKV e c) e SV40+ amplifica un frammento di 135 bp specifico per SV40; tutti aggiunti contemporaneamente nella stessa reazione(51).

<u>Regione</u>	<u>Nome</u>	<u>Posizione</u>	<u>Sequenza</u>	
LT	Esterna	PM1+	4022-4045	5'-TCT TCT GGR YTAAAR TCA TGC TCC-3'
		PM1-	4550-4572	5'-TTW TAG RTK CCAACC TAT GGAAC-3'
	Interna	PM2-	4388-4411	5'-GGTAGAAGA CCC YAARGA CTT TCC-3'
		JC+	4086-4108	5'-ATA TTA TGA CCC CCAAAA CCA TG-3'
		SV+	4291-4314	5'-ATAATT TTC TTG TAT AGC AGT GCA-3'
		BK+	4059-4085	5'-GAA TGC TTT CTT CTA TAG TAT GGTATG-3'

**Tabella 2:** Primer utilizzati per l'amplificazione della regione LT con metodica n-PCR multiplex.

La reazione viene allestita in un volume totale di 25 µL contenenti 2U Biotaq DNA polimerase (Bioline, London,U.K.), in presenza di tampone NH<sub>4</sub> Bioline 1x, MgCl<sub>2</sub> 2mM (1mM nella reazione interna), 0,2 mM di dNTPs, [5pmol/µL] di ciascun primer (Roche Diagnostics, Milano, Italia). La quantità di campione aggiunto alla miscela di reazione varia a seconda della tipologia di materiale da testare: nel caso delle urine vengono aggiunti 2,5 µL, mentre nel caso dei campioni di DNA estratti da siero e tampone oro-faringeo vengono utilizzati 10 µL. Nella reazione interna, invece, viene aggiunto 1 µL di amplificato proveniente dalla miscela di reazione esterna.

I campioni vengono amplificati utilizzando un termociclatore Mastercycler Gradient (Eppendorf, Amburgo, Germania) attraverso il programma riportato in **tabella 3**.

<b>Fasi PCR</b>	<b>Programma Esterna</b>		<b>Programma Interna</b>	
Denaturazione iniziale	95°C x 5 min		95°C x 5 min	
Denaturazione	40 cicli	95°C x 40 sec	35 cicli	95°C x 40 sec
Annealing		61°C x 40 sec		55°C x 40 sec
Estensione		72°C x 40 sec		72°C x 40 sec
Estensione finale	72°C x 5 min		72°C x 5 min	

**Tabella 3:** Condizioni utilizzate per l'amplificazione della regione LT mediante n-PCR multiplex.

Come controllo negativo è stata utilizzata dell'acqua DEPC-treated e RNAsi-free (Biotacx Labs, Houston, USA), mentre come controlli positivi sono stati usati campioni di DNA estratti da tessuto cerebrale di soggetto affetto da PML, istologicamente dimostrata (per JCV), da tessuto renale di un soggetto con nefropatia da BKV istologicamente dimostrata (per BKV) e linee cellulari infettate con SV-40 (per SV-40). Data, però, l'esigua quantità di DNA utilizzato nelle condizioni di PCR adottate nel nostro lavoro è stato necessario realizzare una curva di sensibilità per saggiare i limiti del protocollo appena descritto. Per realizzare tale curva sono state testate diluizioni a scalare di un campione di DNA estratto da sangue intero, positivo per JC virus, la cui concentrazione di partenza è di [128 ng/μL]. Le diluizioni sono state testate in doppio, ed è stato possibile amplificare il campione fino alla soglia di [0.5 ng/μL].

### **Saggio qPCR Real-Time**

I campioni di siero risultati positivi mediante metodica qualitativa nPCR multiplex per la regione LT, vengono sottoposti a quantificazione dei livelli di viremia utilizzando il saggio Real-Time PCR. Vengono allestite due reazioni separate ognuna specifica per uno dei PVs umani, JCV e BKV, a seconda di quale PVs è stato identificato all'interno dei campioni; in caso di coinfezione verranno allestite entrambe le reazioni separatamente. La metodica prevede quantificazione tramite tecnica Taqman di tipo assoluto, mediante comparazione con una curva standard costruita utilizzando diluizioni seriali di un campione a concentrazione nota. Come standard di quantificazione sono stati utilizzati plasmidi codificanti l'intero genoma virale, in particolare per BKV il plasmide denominato pBKV (52), mentre per JCV il plasmide pJC-MAD-

1(53). L'analisi viene condotta utilizzando il 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Monza, Italia) su cui viene caricata la reazione allestita come segue: 25 µL di Universal Mastermix (1X), 900 nM di ciascun primer (vedi **tabella 4**), 200 nM di sonda specifica e 10 µL di campione da testare; tutti i campioni vengono analizzati in triplicato. L'amplificazione avviene secondo le seguenti condizioni: 50°C per 2 minuti, denaturazione iniziale a 95°C per 10 minuti e 40 cicli formati da denaturazione a 95°C per 15 secondi seguita da annealing ed estensione a 60°C per 1 minuto.

PV	Primer	Posizione	Sequenza
BKV	BKV for	4986-5012	5'-ATT CAT TCT CTT CAT TTT ATC CTC GTC-3'
	BKV rev	5078-5049	5'-AAT CTT CCC TTAATG AGAAAAGCT TAT TTA-3'
	BKV probe	5016-5046	5'-FAM- CCC TTT GTC AGGGTG AAATTC CTT ACACTT C-TAMRA-3'
JCV	JCV for	4299-4321	5'-GAG TGT TGG GAT CCT GTG TTT TC-3'
	JCV rev	4352-4375	5'-GAG AAG TGG GAT GAA GAC CTG TTT-3'
	JCV probe	4323-4350	5'-FAM- TCA TCACTG GCAAAC ATT TCT TCA TGG C-TAMRA-3'

**Tabella 4:** Primer utilizzati per l'amplificazione della regione LT con metodica Real Time PCR.

### Analisi Immunologica

I campioni di siero sono stati inviati al laboratorio di microbiologia del Dipartimento di Pediatria della Johns Hopkins University School of Medicine (Baltimora, MD, USA) per essere sottoposti ad analisi immunologica allo scopo di valutare la presenza, al loro interno, di anticorpi specifici anti-BKV e anti-JCV. Tale analisi è stata condotta mediante saggio VLP-ELISA (Virus Like Particles - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) su piastre a 96 pozzetti Maxisorb (Nunc, Naperville, IL) contenenti in ogni pozzetto 20 ng di proteine VLP purificate, derivanti dalla VP1 di BKV o di JCV, a seconda dell'impiego. I campioni di siero, prima di essere caricati su piastra, sono stati diluiti, in alcol polivinilico (0,5%), 1:200 per la ricerca di IgG e 1:100 per la ricerca di IgA e IgM. Sono stati, quindi caricati e lasciati a reagire sulla piastra opportunamente preparata con gli antigeni per 1 ora a 37°C. Il legame antigene-immunoglobulina è stato rilevato tramite anticorpi anti IgG, IgA o IgM umane coniugati con perossidasi (Southern BioTech, Birmingham, AL); dopo 30 minuti di incubazione a 37°C, la reazione è stata sviluppata con l'aggiunta di 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) hydrogen peroxidase solution (Kirkegaard and

Perry, Gaitheesburg, MD). La densità ottica (OD), sviluppata in ogni pozzetto, è stata rilevata con un lettore automatico di piastre (Molecular Devices, Menlo Park, CA). Durante tutte le reazioni sono stati utilizzati campioni di siero di controllo positivi e negativi, controlli di sensibilità e di riproducibilità. Se i valori dei campioni di siero, analizzati in triplicato, cadono al di fuori del coefficiente di variazione atteso, l'analisi viene ripetuta. I risultati sono stati registrati sia come valore di OD che come variabile categorica (campione sieropositivo o campione sieronegativo) in base al punto di cut off di assorbanza (0,1 OD) per la popolazione in esame, determinato dallo studio di Viscidi et al. (54).

## **RISULTATI**

### **Analisi Citologica**

Nonostante un'attenta ricerca, in nessuno dei 39 campioni urinari sottoposti ad analisi citologica è stato possibile identificare la presenza di decoy cells.

### **Analisi Molecolare**

La regione LT è stata amplificata in 14 campioni di urina materni (14/25; 56%), identificando 6 BKV(42,8%), 4 JCV (28,6%) e 4 co-infezioni BKV-JCV(28,6%). In particolare i campioni di urina risultati positivi appartengono a 11 donne di cui 1 presenta gravidanza patologica (piastrinopenia); inoltre, come mostrato in **tabella 5**, delle 8 donne con gravidanza fisiologica al secondo trimestre di gestazione, 3 presentano positività ai PVs in entrambi i periodi di gestazione indagati (I e II trimestre), mentre delle restanti 5 donne, 3 si sono positivizzate durante il II trimestre e 2 si sono negativizzate.

I campioni di urina, appartenenti alle 2 donne che sono andate incontro ad aborto, sono risultati positivi all'amplificazione della regione LT mediante analisi molecolare identificando JCV in entrambe le pazienti. Nessuno dei campioni di siero materni analizzati è risultato positivo al DNA dei PVs.

### **Analisi Immunologica**

L'analisi immunologica tramite VLP-ELISA dei campioni di siero raccolti è ancora in corso pertanto non sono ancora disponibili i risultati.

Paziente n°	Tipo di gravidanza	Trimestre	Positività LT nelle urine
2	fisiologica	I trimestre	BKV
		II trimestre	BKK
3	fisiologica	I trimestre	neg
		II trimestre	BKV
5	fisiologica	I trimestre	JCV
		II trimestre	JCV
6	fisiologica	I trimestre	neg
		II trimestre	JCV
7	fisiologica	I trimestre	JCV
		II trimestre	neg
14	fisiologica	I trimestre	neg
		II trimestre	BKV
15	fisiologica	I trimestre	BKV
		II trimestre	neg
18	fisiologica	I trimestre	BKV-JCV
		II trimestre	BKV-JCV
24	patologica	I trimestre	BKV
25	fisiologica	I trimestre	BKV-JCV
27	fisiologica	I trimestre	BKV-JCV

**Tabella 5:** Risultati relativi alle gravidanze in cui almeno un campione per periodo gestazionale analizzato è stato trovato positivo all'amplificazione della regione LT dei PVs.

## DISCUSSIONE

L'identificazione e la corretta classificazione dei Polyomavirus (PVs) umani JCV e BKV costituisce un evento relativamente recente: nel 1971 Gardner et al. (8) ed Padgett et al.(9) identificarono, in modo del tutto indipendente, la presenza di particelle virali di BK virus e JC virus, rispettivamente, nelle urine e nel tessuto cerebrale di due soggetti immunodepressi; l'uno a seguito di trapianto renale con lo sviluppo nel periodo post-operatorio di una stenosi ureterale; l'altro con una insolita malattia demielinizzante del sistema nervoso centrale -Leucoencefalopatia Multifocale Progressiva (PML)- insorta in seguito a terapie immunosoppressive per il morbo di Hodgkin. Da allora il ruolo di questi due virus nella patologia umana è stato estensivamente investigato e i principali aspetti patogenetici, epidemiologici, anatomopatologici e clinici delle due principali patologie ad essi correlate – nefropatia da BK Virus e Leucoencefalopatia Progressiva Multifocale- sono stati adeguatamente chiariti.

Ciò nonostante rimangono oscuri o non sufficientemente dimostrabili altri aspetti in relazione alla storia naturale dell'infezione, ai siti di latenza e soprattutto ai meccanismi più frequenti di trasmissione virale interumana.

Per quanto riguarda questi ultimi, non è ancora chiara la principale modalità di trasmissione virale, anche se l'estrema diffusione dell'infezione farebbe propendere per una trasmissione aerea o, in alternativa, oro-fecale. Studi epidemiologici indicano che circa l'80% della popolazione adulta, sana è stata infettata da JCV e/o BK Virus, come dimostrato dalla presenza di IgG anti-JCV e/o BKV; questa percentuale di sierconversione è più bassa quando si analizza una popolazione infantile o adolescenziale. Studi epidemiologici effettuati su neonati hanno mostrato la presenza di IgG anti-JCV e/o BKV, stando ad indicare che l'infezione può essere molto precoce o, ipoteticamente intrauterina; alcuni autori hanno esaminato quest'ultima possibilità, ovvero, come per altri virus quali CMV, HSV, la possibilità di un passaggio trans-placentare di genoma virale, con risultati ampiamente discordanti (17).

Questo studio rappresenta la prima investigazione sistematica della infezione da PVs, mediante metodiche molecolari ed immunologiche, eseguito durante l'intero periodo della gravidanza umana ed esteso al primissimo periodo di vita del neonato. Punto di forza di questo studio -di carattere osservazionale- consiste nella possibilità di confrontare i dati di sierconversione, con la presenza di genoma di PVs valutata tramite metodiche molecolari, sia qualitative che quantitative, all'interno delle stesse popolazioni di soggetti in esame, rappresentate da donne in stato di gravidanza, sia fisiologica che patologica, e dai rispettivi neonati durante il primo mese di vita.

Come già precedentemente espresso, poiché non esistono in letteratura altri studi pubblicati utilizzando metodiche di indagine di biologia molecolare ma solo di tecniche di carattere immunologico, i nostri risultati non sono facilmente comparabili con quelli di altri autori. Lo studio di Taguchi et al.(44), eseguito su 80 gravide, mostrò la presenza di IgM anti-BKV nel sangue materno in 6 casi, e in 3 campioni di sangue di cordone ombelicale dei loro neonati. Rziha et al. (55) esaminarono 846 campioni di sangue di altrettanti neonati sani mediante immunofluorescenza indiretta per la ricerca di IgM anti-BKV, identificando 77 campioni positivi (7%), suggerendo l'ipotesi di una discreta frequenza di infezione trans-placentare di BKV. Tali risultati sono stati successivamente contestati da Shah et al.(56) come largamente non specifici. Gibson et al.(45) esaminando 430 donne gravide identificarono presenza di decoy cells in 40 casi, 10 dei quali mostravano IgM anti-BKV o JCV, ma in nessun caso anticorpi specifici furono identificati nei campioni di sangue di cordone ombelicale dei loro neonati.

Più recentemente Pietropaolo et al (57) hanno effettuato uno studio con tecniche molecolari di identificazione di genoma virale su tessuti placentari e su organi fetali prelevati da materiali abortivi. In questo studio, eseguito su 15 aborti, gli autori hanno osservato genoma di BKV nell'80% dei casi di tessuto placentare e nell'80 e 60% rispettivamente di tessuto cerebrale e renale dei corrispondenti feti abortiti. Questa indagine è stata eseguita tramite estrazione di DNA da tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina seguita da amplificazione mediante nested-PCR, è perciò possibile che i risultati possano essere stati inficiati da una contaminazione tra i tessuti ed il sangue materno, potenzialmente contenente genoma virale. In questo studio peraltro non sono riportati i dati sulla presenza o assenza di genoma virale nei campioni di sangue periferico delle madri.

Recentemente Zhang et al. (33) in uno studio condotto su femmine gravide di topi sperimentalmente infettati nella cavità peritoneale durante la fase terminale della gravidanza con PVs murino (*Murine Polyoma virus- MuPyV*) hanno dimostrato la presenza di genoma virale nel sangue del cordone ombelicale nell'86% dei topi nati da madri infette. I risultati di questo studio indicano quindi la capacità dell'analogo murino dei Polyomavirus umani di attraversare la barriera placentare, quando sono presenti elevate concentrazioni plasmatiche virali, tipiche in condizioni di infezione virale acuta. Da questo studio emerge per analogia, nonostante le differenze anatomiche tra la placenta umana e murina, e le differenze tra i PVs umani e il PV murino, la possibilità di trasmissione materno-fetale nell'uomo in particolari condizioni patologiche o con determinate cariche virali.

Nel nostro precedente studio (48), condotto su di una popolazione non selezionata di 300 donne durante la fase terminale di gravidanza, è stata valutata la possibile trasmissione materno-fetale dei PVs mediante metodiche molecolari di tipo qualitativo. I risultati del nostro precedente studio hanno messo in evidenza come in fase tardiva di gravidanza, la riattivazione dei PVs sia un evento altamente infrequente, infatti solo 1 campione di urina su 300 è risultato positivo all'analisi citologica per la ricerca di decoy cells, nonostante il 26% di campioni sia risultato positivo alla ricerca molecolare di genoma appartenente ai PVs. Sulla base di questi dati e sui dati raccolti dall'analisi dei campioni di sangue periferico materno (5,5% dei campioni risultati positivi alla presenza di PVs) e dei campioni di sangue prelevati dai cordoni ombelicali dei neonati al momento del parto (nessun campione risultato positivo all'analisi molecolare), è inoltre emerso che, nella popolazione presa in esame nel precedente studio, non si è avuta evidenza di trasmissione materno-fetale dell'infezione.

I risultati relativi a questo anno di dottorato risultano per il momento parziali date le fasi iniziali in cui si trova lo studio in esame, per tanto risultano di difficile interpretazione. Nonostante ciò, emerge come, a conferma dei dati precedentemente illustrati, la riattivazione dei PVs in fase di

gravidanza risulta essere infrequente, infatti in nessuno dei 14 campioni di urina risultati positivi alle indagini molecolari per la presenza di genoma virale di PVs, sono state ritrovate, mediante attenta analisi citologica, decoy cells. Emerge, inoltre, dalla parziale discrepanza dei risultati ottenuti molecolarmente sui campioni di urina materni, raccolti durante il primo e il secondo trimestre di gravidanza, come in differenti periodi di gestazione, l'escrezione dei PVs nelle vie urinarie avvenga in modo intermittente, coincidendo con differenti livelli di immunosoppressione che si possono verificare nel corso di una gravidanza.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Shah KV. (2000). Human polyomavirus BKV and renal disease. *Nephrol Dial Transplant* **15**: 754-755.
2. Nebuloni M, Tosoni A, Boldorini R et al. (1999). BK virus renal infection in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Patol Lab Med* **123**: 807-811.
3. Boldorini R, Omodeo-Zorini E, Viganò P, Nebuloni M, Mena M, Monga G. (2000). Cytologic and biomolecular diagnosis of polyomavirus infection in urine specimens of HIV-positive patients. *Acta Cytol* **44**: 205-210.
4. Chan PK, Iq KW, Shiu SY, Chiu EK, Wong MP, Yuen KY. (1994). Association between polyomaviruria and microscopic haematuria in bone marrow transplant recipients. *J Infect* **29**:139-146.
5. Randhawa PS, Filkelstein V, Scantlebury V et al. (1999). Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplant* **67**:103-109.
6. Van Regenmortel MHV, Fouquet C.M, Bishop DHL. (2000). Virus Taxonomy: The classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy, VIIth report of the ICTV. Academic Press, San Diego
7. Hirsch HH. (2005). BK virus: opportunity makes a pathogen. *Clin Infect Dis.* **41**, 354-360.
8. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme, B. (1971). New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet.* **7712**:1253-1257.
9. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. (1971). Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet.* **7712**:1257-1260.

10. Richardson E. (1961). Progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med.* **265**:815-823.
11. Ferber D.(2002). Virology. Monkey virus link to cancer grows stronger. *Science.* **296**:1012-1014.
12. Bocchetta M, Di Resta I, Powers, A, et al. (2000). Human mesothelial cells are unusually susceptible to simian virus 40-mediated transformation and asbestos cocarcinogenicity. *Proc Natl Acad Sci.* **97**:10214-10219
13. Cole NC, Conzen SD. (2001). In: Fields Virology, 4th Ed., Lippincott-Raven, PA, 2141-2174
14. Imperiale MJ. (2000). In: Khalili K, Stoner GL, editors. Human Polyomavirus:molecular and clinic perspective. 1st Ed., Wiley-Liss, 53-72
15. Jobes DV, Chima SC, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. (1998). Phylogenetic analysis of 22 complete genomes of the human polyomavirus JC virus. *J Gen Virol.* **79**: 2491-2498
16. Jin L, Gibson PE, Knowles WA, Clewley JP. (1993). Genomic typing of BK virus in clinical specimens by direct sequencing of polymerase chain reaction products. *J Med Virol.* **39**: 50-56
17. Agostini HT, Jobes DV, Stoner GL. (2000) In: Khalili K, Stoner GL, editors. Human Polyomavirus:molecular and clinic perspective. 1st Ed., Wiley-Liss, 491-526
18. Major EO (2001) In: Fields Virology, 4th Ed., Lippincott-Raven, PA, 2175-2196
19. Kim HS, Henson JK, Frisque RJ. (2000) In: Khalili, K., Stoner, G.L., editors. Human Polyomavirus:molecular and clinic perspective. 1st Ed., Wiley-Liss, 73-126
20. Yogo Y, Sugimoto C. (2000). In: Khalili, K., Stoner, G.L., editors. Human Polyomavirus:molecular and clinic perspective. 1st Ed., Wiley-Liss, 128-148.
21. Sock E, Renner K, Feist D, Leger H, Wegner M. (1996). Functional comparison of PML-type and archetype strains of JC virus. *J Virol.* **70**:1512-1520.
22. Ault GS. (1997). Activity of JC virus archetype and PML-type regulatory regions in glial cells. *J Gen Virol.* **78**:163-169.
23. Ault GS, Stoner GL. (1993). Human polyomavirus JC promoter/enhancer rearrangement patterns from progressive multifocal leukoencephalopathy brain are unique derivatives of a single archetypal structure. *J Gen Virol.* **74**:1499-1507.

24. Yogo Y, Kitamura T, Sugimoto C, Ueki T, Aso Y, Hara K, Taguchi F. (1990). Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from nonimmunocompromised individuals. *J Virol* **64**:3139-3143.
25. Yoshiike K, Takemoto KK. (1986) In: Salzman NP The Papovaviridae, vol.1, The Polyomaviruses Plenum Press: NY, 295-326.
26. Monaco MC, Atwood WJ, Gravell M, Tornatore CS, Major EO. (1996). JC virus infection of hematopoietic progenitor cells, primary B lymphocytes, and tonsillar stromal cells: implications for viral latency. *J Virol*. **70**: 7004-7012.
27. Breau, WC, Atwood WJ, Norkin LC (1992). Class I major histocompatibility proteins are an essential component of the simian virus 40 receptor. *J Virol* **66**: 2037-2045.
28. Gordon J, Krynska B, Otte J, Houff SA, Khalili K. (1998) Oncogenic potential of human neurotropic papovavirus, JCV, in CNS. *Dev Biol Stan* **94**:93-101.
29. Roploeg MD, Storch GA, Clifford DB. (2001). Bk virus: a clinical review. *Clin Infect Dis* **33**: 191-202.
30. Greenle JE. (1998). Progressive multifocal leukoencephalopathy--progress made and lessons relearned. *New Eng J Med*. **338**: 1378-1380.
31. Vianelli N, Renga N, Azzi A De Santis RD, Bandini G, Tosi P, Tura S. (2000) Sequential vidarabine infusion in the treatment of polyoma virus-associated acute haemorrhagic cystitis late after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone marrow transplant*. **25**:319-320.
33. Zhang S, McNeese L, Butel JS. (2005). Quantification of vertical transmission of Murine Polyoma virus by real-time quantitative PCR. *J Gen Virol*. **86**:2721-2729.
34. Minor P, Pipkin PA, Cutler K, Dunn G. (2003). Natural infection and transmission of SV40. *Virol*. **314**:403-409.
35. Possati L, Bartolotta E. (1981). Attempts to isolate BK virus from children affected by various diseases. *Acta Virol*. **25**:254-255.
36. Goudsmit J, Wertheim-Van Dillen P, Van Strien A. (1982). The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J Med Virol*. **10**: 91-99.
37. Boldorini R, Brustia M, Veggiani C, Barco C, Adorno S, Monga G. (2005). Periodic assessment of urine and serum by cytology and molecular biology as a diagnostic tool for BK virus nephropathy in renal transplant patients. *Acta Cytol*. **49**: 235-243.

38. Arthur RR, Shah KV. (1989). Occurrence and significance of papovaviruses BK and JC in the urine. *Prog Med Virol* **36**:42-61.
39. Brown P, Tsai T., Gajdusek, DC. (1975). Seroepidemiology of human papovaviruses. Discovery of virgin populations and some unusual patterns of antibody prevalence among remote peoples of the world. *Am J Epidemiol* **102**:331-340.
40. Bofill-Mas S, Pina S, Girones R. (2000). Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol.* **66**:238-245.
41. Shah KV. (2000). Human polyomavirus BKV and renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* **15**:754-755.
42. Dei R, Marmo F, Corte D, Sampietro MG, Franceschini E, Urbano P. (1982). Age-related changes in the prevalence of precipitating antibodies to BK virus in infants and children. *J Med Microbio.* **15**:285-291.
43. Bergsagel DJ, Findgold MJ, Butel JS et al (1992). DNA sequences similar to those of simian virus 40 in ependymomas and choroid plexus tumors of childhood. *New Engl J Med.* **326**:988-993.
44. Taguchi F, Nagaki D, Saito M, Haruyama C, Iwasaki K, Suzuki T. (1975). Transplacental transmission of BK virus in human. *Jpn J Microbiol* **19**:395-398.
45. Gibson PE, Field AM, Gardner SD, Coleman DV. (1981). Occurrence of IgM antibodies against BK and JC polyomaviruses during pregnancy. *J Clin Pathol* **34**:674-679.
46. Chang, D, Wang M, Ou WC, Lee MS, Ho HN, Tsai RT. (1996b). Genotypes of human polyomaviruses in urine samples of pregnant women in Taiwan. *J med Virol.* **48**: 95-101.
47. Coleman DV, Wolfendale MR, Daniel RA, Dhanjal NK, Gardener SD, Gibson PE, Field AM. (1980). A prospective study of human polyomavirus infection in pregnancy. *J Infect Dis* **142**:1-8.
48. Boldorini R, Veggiani C, Amoruso E, Allegrini S, Miglio U, Paganotti A, Ribaldone R, Monga G. (2008). Latent human polyomavirus infection in pregnancy: investigation of possible transplacental transmission. *Pathology.***40**:72-7.
49. Koss L (1979). 3rd ed. Philadelphia,PA: Lippincott JB, 711-48.
50. Agostini HT, Brubaker GR, Shao J, Levin A., Ryschkewitsch CF, Blattner WA, Stoner GL (1995). BK virus and a new type of JC virus excreted by HIV-1 positive patients in rural Tanzania. *Arch Virol.* **140**:1919-1934.

51. Fedele CG, Ciardi M, Delia S, Echevarria JM, Tenorio A. (1999). Multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection and typing of polyomavirus JC, BK and SV40 DNA in clinical samples. *J Virol Meth.* **82**:137-44.
52. Seif I, Khoury G, Dhar R (1979). The genome of human papovavirus BKV. *Cell.* **18**:963-977.
53. Frisque, R.J., Bream, G.L., Cannella, M.T., (1984) Human polyomavirus JC virus genome. *J Virol.* **51**:458-469.
54. Viscidi RP, Rollison DEM, Viscidi E, Clayman B, Rubalcaba E, Daniel R, Major EO, Shah KV. (2003). Serological cross-reactivities between antibodies to simian virus 40, BK virus, and JC virus assessed by virus-like-particle-based enzyme immunoassays. *Clin Diagn Lab Immunol* **10**:278-285.
55. Rziha H-J, Bornkamm GW, Zur Hausen H (1978) BK virus: I. Seroepidemiologic studies and serologic response to viral infection. *Med Microbiol Immunol* **165**:73-81.
56. Shah K, Daniel R, Madden D, Stagno S. (1980). Serological investigation of BK papovavirus infection in pregnant women and their offspring. *Infect Immun* **30**:29-35.
57. Pietropaolo V, Di Taranto C, Degener, AM, Jin L, Sinibaldi L, Baiocchini A, Melis M, Orsi N (1998). Transplacental transmission of human polyomavirus BK. *J Med Virol.* **56**:372-6.

## SEZIONE 2:

### CORSI FREQUENTATI (per ciascun anno del corso)

- Corso di statistica medica
- Corso di inglese

### CONGRESSI FREQUENTATI (elenco completo: denominazione congresso, sede, data)

#### Seminari:

#### Primo anno:

- SILENZIAMENTO GENICO MEDIANTE ESPRESSIONE DI SHRNA, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 10/01/2007
- AUTOANTIBODIES IN SYSTEMIC SCLEROSIS: FROM CLINICAL SUBSET TO PATHOGENETIC, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 12/01/2007
- DETECTION DI MRNA MEDIANTE ANALISI STATISTICA, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 17/01/2007
- GENETICA E PREVENZIONE DEI TUMORI EREDO-FAMILIARI DI MAMMELLA E OVAIO, Ospedale Maggiore della Carità, Novara, 19/01/2007
- IMAGING MASS SPECTROMETRY, Ospedale Maggiore della Carità, Novara, 24/01/2007
- GENE THERAPY STRATEGIES FOR PHENYLKETONURIA, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 01/02/2007
- VITA, OPERE E MIRACOLI DELL'EPATOCITA, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 09/02/2007
- THE LONG HAN OF THE SMALL RNAS REACHES INTO SEVERAL LEVELS OF GENE REGULATION, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 15/02/2007
- PROTEIN MICROARRAYS DEVELOPMENT OF NEW SUPPORTS FOR IMPROVED SENSITIVITY, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 14/03/2007
- MICROARRAYS DI TESSUTI: UNA STRATEGIA PER IDENTIFICARE NUOVI BIOMARCATORI TUMORALI, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 16/03/2007
- DROSOPHILA AS A MODEL FOR AGING AND CANCER, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 16/03/2007
- RELAZIONE TRA STRUTTURA E FUNZIONE DELLE PROTEINE MEDIANTE ANALISI DEL PROTEIN DATA BASE, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 12/04/2007
- PATHOGENIC VIRUSES: SMART MANIPULATORS OF THE INTERFERON SYSTEM, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 19/04/2007
- DIFETTI GENETICI DEL PRE-B CELL RECEPTOR, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 16/05/2007
- THE REGULATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS BY SMAD SIGNALLING, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 25/05/2007
- TRANSLATING BASIC SCIENCE INTO THERAPEUTIC STRATEGIES FOR SHWACHMAN DIAMOND SYNDROME, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 28/05/2007

- TUMORI GLIALI, Università di Torino, Torino, 01/06/2007
- SINDROMI AUTOINFIAMMATORIE, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 04/06/2007
- LA GENESI DEI GLIOMI E I SUOI RISVOLTI PROGNOSTICI E TERAPEUTICI, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 14/06/2007
- BIOINFORMATICS TOOLS FOR THE ANALYSES OF UTRS AND FOR THE PRODUCTION OF ALTERNATIVE SPLICE SITE, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 21/06/2007

Secondo anno:

- HUMAN PAPILOMA VIRUSES LOADS AND ITS ASSOCIATION WITH NON MELANOMA SKIN CANCER, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 19-12-2007
- BIOLOGIA MOLECOLARE E GENETICA IN AMBITO FORENSE, PRINCIPALI APPLICAZIONI E SVILUPPO DELLE NUOVE TECNICHE, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 14/1/2008
- K<sup>+</sup> CHANNELS IN THE HEART: IN AND OUT OF CONTROL, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 21-1-2008
- INTEGRIN TRAFFICKING AND TUMOR CELLS INVASIVENESS, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 23/1/2008
- LA MICROSCOPIA A FORZA ATOMICA NELLA RICERCA BIOMEDICA: DALLE IMMAGINI ALLE INTERAZIONI, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 24-1-2008
- METODI E APPLICAZIONI DELLE NUOVE TECNOLOGIE DI SEQUENZIAMENTO ULTRAMASSIVO, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 6/2/2008.
- LA PROTEINA HMGB1 E UN SEGNALE DI DANNO TISSUTALE, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 7/2/2008
- CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DELLA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 28/2/2008
- ANALYTIC VACCINOLOGY AND HUMAN CITOMEGALOVIRUS HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES AS TOOL TO IDENTIFY NOVEL ANTIGENS FOR PROTECTIVE VACCINATION, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 5/3/2008
- APPLICATIONS OF GENE EXPRESSION PROFILE TO CANCER RESEARCH, 6/3/2008
- FATTY LIVER PRESERVATION AGAINST ISCHEMIA REPERFUSION INJURY, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 7/3/2008
- IL SISTEMA GHRELIN ASPETTI ENDOCRINI E METABOLICI, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 13/3/2008
- TO REPRESS GENE EXPRESSION JUST TAKE OUT VINEGAR ROLE OF THE CLASS 2 HISTONE DEACETYLASE HDAC4, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 13/3/2008
- IMMUNOLOGIA DELLA PSORIASI, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 20/3/2008
- MUTAZIONI DEL GENE DELL'INSULINA COME CAUSA DI DIABETE NEONATALE/INFANTILE UN NUOVO ESEMPIO DA MALATTIA DA MISFOLDING, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 3/4/2008
- MODIFICAZIONI DEL METABOLISMO DEL FERRO NELLA RISPOSTA INFIAMMATORIA, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 9/4/2008

- INTERAZIONE TRA TUMORI E SISTEMA IMMUNITARIO NELLA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA IL RUOLO DELLA VIA METABOLICA DEL MEVALONATO, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara 14/4/2008
- LA BIOLOGIA MOLECOLARE NELLA CARATTERIZZAZIONE DEI TUMORI, Aula CERMS, Azienda Ospedaliera San Giovanni Battista, Torino, 16/4/2008
- EPIDEMIOLOGIA DELL'INFEZIONE HPV E DEL CANCRO DELLA CERVICE UTERINA UN MODELLO DINAMICO, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara 17/4/2008
- GHRELIN E PANCREAS ENDOCRINE, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara 24/4/2008
- THE MECHANISMS OF CELL INFECTION WITH HEPATITIS C VIRUS- NOVEL POTENTIAL TARGETS FOR THERAPEUTIC INTERVENTATIONS, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara 15/5/2008
- LA RICERCA FARMACOLOGICA, DAL LABORATORIO ALLA CLINICA, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara 22/5/2008
- SISTEMA DEGLI ENDOCANNABINOIDI NUOVO TARGET TERAPEUTICO PER L' OBESITA' E LE SUE COMPLICANZE CARDIO-METABOLICHE, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara 23/5/2008
- COPY NUMBER VARIATIONS NON SOLO RITARDO MENTALE, 26/5/2008
- IL TRASFERIMENTO TECNOLOGICO DALL'UNIVERSITA' ALL'IMPRESA, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 3 e 11/06/2008
- CAP ANALYSIS GENE EXPRESSION ANALYSIS OF TRANSCRIPTIONAL COMPLEXITY AND REGULATION, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara 5/6/2008
- MECHANICAL VENTILATION AND MULTIPLE ORGAN FAILURE, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara 12/6/2008
- PROBLEM SOLVING IN PATOLOGIA EPATICA, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara, 13/06/2008
- TECNICHE FISH NELLO STUDIO DI LINFOMI NON-HODGKIN, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara 26/6/2008
- RECENTI ASPETTI IN TEMA DI MALATTIE UROMODULINA ASSOCIATE, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara 3/7/2008
- RECOMBINANT PROTEIN EXPRESSION, 1/7/2008
- RECOMBINANT ANTIBODIES AND OTHER AFFINITY REAGENTS, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara 2/7/2008
- DISPLAY TECHNOLOGIES PHAGE, YEAST, BACTERIA AND RIBOSOMA, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara 16/7/2008
- FLUORESCENT PROTEIN, Università del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze Mediche, Novara 18/7/2008

Congressi:

- MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY OF CANCER, University of Birmingham, Department of Pathology, Division of Cancer Studies, Birmingham (UK), 19/02/2007 – 23/02/2007
- DIAGNOSTICA CITOLOGICA E MOLECOLARE NEL PERCORSO CLINICO DEI PAZIENTI CON CARCINOMA UROTELIALE, Università di Ferrara, Ferrara (IT), 10/05/2007
- PRIMO CONGRESSO INTERNAZIONALE SULLA RICERCA TRASLAZIONALE IN MEDICINA, Villa Contarini, Fondazione Ghirardi, Padova (IT), 10/06/2007 – 12/06/2007
- IV INTERNATIONAL CONFERENCE ON POLYOMAVIRUSES AND HUMAN DISEASES, Barcellona 30/09/2007-03/10/2007

COMUNICAZIONI A CONGRESSI (elenco completo: autori, titolo, denominazione congresso, sede, data)

A) *Comunicazioni presentate personalmente (orali o poster)*

*Comunicazioni orali:*

- **Allegrini S.**, Veggiani C., Amoruso E, Miglio U., Paganotti A., Ribaldone E R, Boldorini R. HUMAN POLYOMAVIRUS INFECTION AND PREGNANCY: INVESTIGATION ON POSSIBLE VERTICAL TRANSMISSION. IV international conference on Polyomaviruses and human diseases, Barcellona, 01/10/2007.
- **Allegrini S**  
DIAGNOSTICHE MOLECOLARI IN ANATOMIA PATOLOGICA - Infezione di BK virus in un soggetto trapiantato renale-. Azienda Ospedaliera Maggiore della Carità, Novara, 22/11/2007, 25/05/2008 e 27/09/2008.

*Poster:*

- Boldorini R., Veggiani C., Paganotti A., **Allegrini S.** Miglio U. SEQUENCE VARIATION IN THE REGULATORY REGION OF BK VIRUS ISOLATED FROM KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENT. Primo congresso internazionale sulla ricerca internazionale. Padova (IT), 12/06/2007.  
Poster

B) *Altre comunicazioni:*

- Miglio U., **Allegrini S.**, Veggiani C., Paganotti A., Boldorini R. SEQUENCE VARIATION IN THE REGULATORY REGION OF HUMAN POLYOMAVIRUSES ISOLATED FROM KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENT. IV international conference on Polyomaviruses and human diseases, Barcellona, 02/10/2007
- Boldorini R., **Allegrini S.**, Miglio U., Paganotti A., Veggiani C. FREQUENCY OF POLYOMAVIRUS DETECTION IN SURGICAL SAMPLES OF UNSELECTED HUMAN TUMOURS. IV international conference on Polyomaviruses and human diseases, Barcellona, 03/10/2007

ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI NEL CORSO DEL DOTTORATO (elenco completo):

**LATENT HUMAN POLYOMAVIRUS INFECTION IN PREGNANCY INVESTIGATION AND POSSIBLE TRANSPLACENTAL TRANSMISSION**

Boldorini R, Veggiani C, Amoruso E, **Allegrini S**, Miglio U, Paganotti A, Ribaldone R, Monga G.

*Pathology*, 2008 January 40 (1);72-77

DOI: 10.1080/00313020701716458

**DETECTION, DISTRIBUTION, AND PATHOLOGIC SIGNIFICANCE OF BK VIRUS STRAINS ISOLATED FROM PATIENTS WITH KIDNEY TRANSPLANTS, WITH AND WITHOUT POLYOMAVIRUS-ASSOCIATED NEPHROPATHY**

Boldorini R, **Allegrini S**, Miglio U, Paganotti A, Veggiani C.

*Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, in stampa

**GENOMIC MUTATIONS OF VIRAL PROTEIN 1 DO NOT AFFECT THE DEVELOPMENT OF BK VIRUS NEPHROPATHY IN KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENTS**

Boldorini R, **Allegrini S**, Miglio U, Paganotti A, Veggiani C, Mischitelli M, Pietropaolo V, Monga G.

*Modern Pathology*, Submitted