

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
Scuola di Dottorato in Scienze biomediche cliniche e sperimentali
Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute
Dottorato di Ricerca in *Sanità Pubblica*
Ciclo XXV°

Valutazione dell'impiego di tamponi salivari secchi (DSS, dried saliva swab) per la diagnosi e lo screening neonatali dell'infezione congenita da Cytomegalovirus

Area Scienze Mediche, Settore scientifico-disciplinare: MED/42

Tesi di Dottorato di:
Laura BUBBA

Tutor: Dott. **Sandro BINDA**

Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa **Mirella PONTELLO**

Anno Accademico 2011-2012

INDICE

<i>Abstract</i>	6
1. Premessa	9
2. Introduzione	12
2.1–Nomenclatura e classificazione.....	13
2.2- Morfologia.....	14
2.3 – Il genoma di CMV.....	15
2.4 –Il ciclo vitale di CMV.....	17
2.5 –Trascrizione.....	18
2.6 –Le proteine.....	19
2.7 –Patologie e patogenesi.....	21
2.8 –Epidemiologia.....	25
2.9 –Epidemiologia delle infezioni congenite.....	27
2.10 –Terapia delle infezioni da CMV.....	29
2.11 – Profilassi delle infezioni da CMV.....	31
a – <i>Vaccini a virus vivo</i>	32
b – <i>Vaccini a subunità</i>	35
c – <i>Vaccini ricombinanti</i>	36
2.12 – Metodi diagnostici.....	37

a – <i>Prove di isolamento</i>	37
b – <i>Ricerca delle proteine virali</i>	38
c – <i>Ricerca degli acidi nucleici virali</i>	38
d – <i>Ricerca delle particelle virali</i>	38
e – <i>Sierologia</i>	39
f – <i>DBS-test</i>	39
g – <i>DUS-test</i>	41
h – <i>Real Time PCR</i>	42
3 – Materiali e metodi	45
3.1 Fase I: Validazione	45
3.1.1 Estrazione DSS con kit commerciale.....	45
a – <i>Amplificazione mediante nested-PCR</i>	47
b – <i>Visualizzazione dei prodotti di amplificazione</i>	48
3.1.2 Estrazione CSS con shock termico.....	49
3.1.3 Metodologia di riferimento: isolamento virale rapido (IR-p72)	50
a – <i>Allestimento Shell Vials (SV)</i>	50
b – <i>Applicazione dell'IR-p72 su campioni di saliva liquida</i>	51
3.1.4 Popolazione in studio nella fase I.....	53
a – <i>Raccolta e trattamento dei campioni DSS e CSS clinici</i>	53
3.2 Fase II: Validazione	55

3.2.1 Estrazione DSS senza kit commerciale.....	55
3.2.2 Popolazione in studio nella fase II.....	56
<i>a – Trattamento dei campioni DSS e CSS clinici.....</i>	<i>58</i>
3.3 Fase III: Validazione.....	59
3.3.1 Verifica dell'utilizzo di una Real Time-PCR commerciale su DSS	59
<i>a – Amplificazione mediante nested-PCR.....</i>	<i>62</i>
<i>b – Amplificazione mediante Real Time-PCR (Argene).....</i>	<i>62</i>
<i>c – Interpretazione dei risultati.....</i>	<i>65</i>
3.3.2 Popolazione in studio nella fase III.....	66
<i>a – Trattamento dei campioni.....</i>	<i>67</i>
3.4 Fase IV.....	68
3.4.1 Messa a punto RFLP su DSS.....	68
<i>a – Amplificazione e rilevazione dei genotipi di CMV mediante RFLP.....</i>	<i>69</i>
<i>b – Interpretazione del risultato.....</i>	<i>70</i>
3.4.2 Messa a punto di una Real Time-PCR in house per i genotipi gB e gH.....	71
<i>a Amplificazione mediante Real Time-PCR in-house presso LUMC, Olanda.....</i>	<i>72</i>
<i>b – Interpretazione dei risultati.....</i>	<i>73</i>

3.4.3 Popolazione in studio nella fase IV.....	73
4 – Risultati.....	76
4.1 Fase I.....	76
4.2 Fase II.....	77
4.3 Fase III.....	78
4.4 Fase IV.....	80
5 – Conclusioni.....	86
6 Allegati.....	94
6.1 Modulo adesione allo studio della fase I.....	94
6.2 Volantino informativo per le scuole.....	97
6.3 Adesione allo studio nelle scuole.....	99
6.3 Progetto di collaborazione con il LUMC (versione italiana).....	99
Bibliografia.....	103

ABSTRACT

Background

The identification of infected newborns at birth is necessary to prevent, or at least reduce, possible serious damages due to congenital Cytomegalovirus infection (cCMV). Viral isolation assay on saliva and urine specimens collected until the 14th day of birth is considered the gold standard method for cCMV's diagnosis, but it is a slow method and it needs specialized laboratories. Easy and inexpensive collection, handling and processing of samples are important for implementation of neonatal screening. The aim of this PhD project is to develop a method which could meet the requirements of a screening test: low cost (sampling, reagents and workload) with high sensibility and specificity; the second purpose is to identify a possible factor of poor prognosis.

Material and Methods

In this study dried saliva swabs or DSS, a nylon-flocked saliva swab (Copan) without any medium, were used to collect clinical specimens. The study was divided in four phases, each one divided in two steps: validation and clinical tests. In the 1st phase 410 DSS were collected from 21 babies with cCMV (follow-up group) and 365 from newborns or children who were in Mangiagalli's Hospital on July 2008 (random group). All DSS were extracted by commercial kit and the results were compared to classical saliva swabs or CSS collected and stored in Viral transport medium (VTM) at 4°C. CSS were tested by rapid viral isolation (IR-p72) and nested-PCR in house (n-PCR). In the 2nd phase an extraction in-house was performed on DSS, and dried swabs were re-hydrated with E-MEM (cell's growth medium). 192 DSS were collected: 34 from a follow up group, 141 from children who attending preschool and 17 from babies with suspect of infection. All results were compared between DSS just agitated by vortex or extracted by thermal shock

(ts) and CSS tested by nested-PCR. In the 3rd phase a commercial Real Time-PCR (RT-PCR) was performed for DSS vortexed or extracted by ts. Previously poor results were obtained with samples in E-MEM, therefore molecular grade water was preferred to rehydrating DSS. 64 dried saliva swabs were collected from 45 follow-up children and 14 babies with suspect of infection. Results were compared between DSS tested in RT-PCR or n-PCR and CSS in n-PCR. In the 4th phase a genotyping methods were performed on DSS: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) for gB gene and, by collaboration with a Dutch group from LUMC (Leids Universitair Medisch Centrum), a Real Time-PCR in-house for genes gB and gH. So 101 DSS were collected and tested from follow up group's children and suspected of infection.

Results

In every phase the sensibility between DSS and CSS was 100% regardless of treatment and studied groups. The specificity was 93% between DSS and CSS tested by IR-p72; it was higher if compered to CSS in n-PCR. In follow-up group the specificity was 58 and 70% between DSS and CSS in n-PCR. The most frequent genotype was gB1 both in RFLP (38%) and RT-PCR (34%). The most frequent gH strain was gH1 (48%). 19% of samples had mixed genotype of gB or gH or both; 3 patient (3%) had three gB strain in the same time.

Conclusion

Dried saliva swab is a good tool to detect CMV infection. Despite the treatments Low specificity in follow-up group is a consequence of high sensibility of DSS-test. In fact the babies of the follow up group had CMV infection, therefore the positive results might have been no false. Real Time-PCR (Argene) on DSS treated in molecular biology grade water gave optimal results. Pre-PCR treatments (vortexing or vortexing plus thermal shock),

seem to have no influence. Genotyping from DSS by Real time-PCR could be a good alternative to genotyping from DBS (dried blood spots), because saliva has higher viral load. Confirmation of these data in a larger study will indicate that Real Time-PCR DSS testing (treat adding grade water and just vortexing), being simple and cheap , could be a suitable method for a neonatal cCMV infection screening.

PREMESSA

L'infezione congenita da Cytomegalovirus (cCMV) è una delle più frequenti infezioni a trasmissione verticale dell'uomo, nonché la principale causa di sordità neurosensoriale per cause non genetiche. Il CMV rappresenta un serio problema di Sanità Pubblica (1). E' stato stimato che una percentuale compresa tra lo 0.2% e il 2.2% dei nati vivi è infetta, ma solo una ridotta quota mostra una qualche sintomatologia al momento della nascita. La maggior parte dei bambini infetti appena nati non manifesta alcun segno clinico, ma una percentuale compresa tra il 10 e il 15% degli asintomatici può comunque sviluppare sordità o altre sequele durante il corso dell'infanzia associate all'infezione (2). Uno screening neonatale per la ricerca del Cytomegalovirus è auspicabile al fine di individuare tutti gli infetti, anche asintomatici, così da monitorarli nel tempo e intervenire con misure migliorative. Ciò è possibile solo grazie ad una rapida diagnosi. Ad oggi l'esame diagnostico ritenuto *gold standard* è l'isolamento virale in coltura tradizionale o rapido (IR p72) di un campione di urina o saliva raccolto entro le prime due settimane di vita (3), eseguibile solo in laboratori virologici specializzati.

Le diverse tecniche di PCR (Polimerasi Chain Reaction) sono più rapide e sempre più spesso vengono utilizzate per diagnosi virologiche, anche su campioni secchi: è già stata dimostrata la loro efficacia su sangue e urine essiccate su carta da filtro (rispettivamente Dried Blood Spots o DBS e Dried Urine Spots o DUS; 4, 5).

I vantaggi nell'utilizzo dei campioni secchi sono molteplici: non è necessario utilizzare alcun mezzo per la conservazione e il trasporto, possono essere inviati a laboratori lontani e archiviati per lungo tempo a temperatura ambiente. Sempre più autori utilizzano DBS e DUS per la diagnosi d'infezione da CMV (5) per poter beneficiare dei vantaggi dall'utilizzo dei campioni secchi e delle metodiche di biologia molecolare. Tuttavia, dai

risultati ottenuti in un pannello di controllo esterno di qualità, è emerso che circa la metà dei laboratori non sono stati in grado di rilevare la presenza di CMV-DNA nei DBS allestiti con sangue con carica virale inferiore o uguale a 10^3 copie/ml (6).

È noto che l'urina e la saliva contengono elevate cariche virali, perciò il loro uso potrebbe ovviare il problema di sensibilità rilevato nei DBS. Essendo le urine più difficili da raccogliere nel neonato in confronto alla saliva, nell'ottica di validare una metodica da applicare ad uno screening neonatale, potrebbe risultare più pratico l'uso dei tamponi salivari (7).

I tamponi salivari secchi (Dried Saliva Swab o DSS), potrebbero dunque rappresentare il campione ideale per uno screening neonatale poiché raggruppano più vantaggi: essendo secchi non necessitano di particolari procedure di conservazione, la saliva è un campione con alta carica virale, viene raccolto facilmente e la ricerca del CMV-DNA mediante PCR può essere eseguita in breve tempo e con un'elevata sensibilità. Inoltre l'applicazione su tale campione di metodi automatizzabili come la Real Time-PCR permetterebbero di ridurre ulteriormente i costi in termini di tempo e risorse umane.

Non essendo stato ancora validato un metodo che utilizzi i DSS, questa tesi di dottorato ha lo scopo di verificare la possibilità di ricercare il CMV-DNA in questi campioni, individuare e validare la metodica meno costosa, più veloce, sensibile e specifica, e quindi più adatta ad uno screening universale.

In aggiunta questa tesi si propone di ricercare un possibile marcatore virologico di prognosi: distinguere i neonati infetti in base al rischio di sviluppare gravi sequele consentirebbe di organizzare il follow-up nel modo più adeguato e di trattare eventualmente i neonati ad alto rischio, con conseguente riduzione dei costi sociali e

sanitari. Alcuni possibili marcatori possono essere individuati secondo alcuni autori nella carica virale alla nascita o nel genotipo infettante (8).

Il lavoro è stato suddiviso in quattro fasi.

Fase I: Validazione e messa a punto di una metodica sensibile e specifica per la ricerca del CMV-DNA in tamponi salivari secchi (Dried Saliva Swab, DSS) e relativa applicazione su neonati random o seguiti in follow-up

Fase II: Validazione di una metodica sensibile e specifica per la ricerca del CMV-DNA su DSS priva di estrazioni commerciali, al fine di renderla economicamente più vantaggiosa in previsione di uno screening neonatale; applicazione su tre gruppi di bambini in follow up, con sospetto di infezione e bambini frequentanti l'asilo nido; presentazione ai genitori delle misure di prevenzione

Fase III: Validazione del DSS-test in Real Time PCR, al fine di rendere la metodica sufficientemente veloce e sensibile per uno screening neonatale; applicazione su un gruppo di bambini in follow up o con sospetto d'infezione

Fase IV: Validazione della genotipizzazione di CMV su DSS dei genotipi gB e gH quali possibili fattori di prognosi, confronto tra RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e Real Time-PCR; applicazione su un gruppo di bambini in follow-up o con sospetto d'infezione (collaborazione con la Dott.ssa de Vries del Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC), Olanda)

2-INTRODUZIONE

I Cytomegalovirus appartengono alla famiglia degli Herpesvirus. Probabilmente sono gli Herpesvirus evolutivamente più antichi; infatti sono stati rinvenuti anticorpi volti contro di essi nel sangue di soggetti appartenenti a tribù isolate del Brasile che non sono invece venute a contatto con malattie altrettanto diffuse come il morbillo o l'influenza (9).

Sono virus largamente distribuiti in natura e sono accomunati da diverse caratteristiche riguardanti sia la crescita che l'effetto che producono sulle cellule infettate e cioè la formazione di inclusioni citoplasmatiche e nucleari che causano a loro volta un ingrossamento della cellula (citomegalia).

La CID (cytomegal inclusion disease) è una malattia nota da lungo tempo, ancor prima che fosse noto l'agente eziologico, ritenuto dapprima un organismo protozoiario e riconosciuto solo più tardi come virus (10).

Proprio dalla citomegalia che accompagna questa malattia, deriva il nome attuale del suo agente eziologico, prima conosciuto come "virus delle ghiandole salivari".

Lipschutz per primo ipotizzò per la CID un'eziologia virale (11). Fu invece Weller a battezzare il CMV con questo nome in seguito all'effetto che esso produceva sui fibroblasti in coltura inoculati con campioni urinari o epatici di bambini affetti da CID (12).

Attualmente CMV ha assunto una grande importanza per la sua enorme diffusione: la sieroprevalenza nella popolazione è del 50%-100% con proporzionalità inversa alla condizione socioeconomica (13). Negli ultimi anni sono aumentate le infezioni sintomatiche da CMV a causa del sempre maggior numero di soggetti immunocompromessi (HIV positivi e trapianti d'organo) stimolando quindi l'interesse nell'approfondire lo studio del virus.

Oggi le conoscenze su CMV sono abbastanza estese sia dal punto di vista morfologico che molecolare: il genoma del ceppo di laboratorio AD169 è stato completamente sequenziato (accession number ad EMBL: X17403) e sono state caratterizzate diverse proteine.

2.1 Nomenclatura e classificazione

La famiglia degli Herpesvirus è suddivisa in tre sottofamiglie in base alle diverse proprietà biologiche di ogni virus (14).

- α herpesvirinae: gli appartenenti a questa sottofamiglia sono caratterizzati da uno spettro d'ospite variabile, un ciclo replicativo breve (circa 24 ore), una replicazione veloce nelle cellule in coltura con lisi delle cellule infettate. A questa sottofamiglia appartengono Herpes Simplex 1 e 2 e Varicella Zoster Virus, in grado di infettare l'uomo.

- β herpesvirinae: è a questo gruppo che appartiene il CMV umano, insieme a Herpesvirus 6. Sono virus con spettro d'ospite ristretto, ciclo riproduttivo lungo (circa 96 ore) ed una lenta propagazione in coltura. I monostrati delle cellule infettate risultano alterati per la presenza di gruppi di cellule rigonfie e rifrangenti. Possono rimanere latenti in alcuni tessuti, tra cui quelli delle ghiandole salivari, del rene e le cellule del sistema circolatorio in generale.

- γ herpesvirinae: sono virus con spettro d'ospite molto limitato. Replicano nei linfociti B e T e nelle cellule del cavo orofaringeo. In coltura possono replicare in cellule linfoblastoidi e, a volte, in cellule endoteliali e fibroblasti. Possono rimanere latenti nei tessuti linfoidi. Tra gli appartenenti a questa sottofamiglia troviamo Epstein-Barr Virus e Herpesvirus 8, di interesse per la patologia umana.

2.2 Morfologia

L'appartenenza alla famiglia degli Herpesvirus è determinata dal possedere caratteristiche strutturali prestabilite. Il CMV possiede tali requisiti: ha DNA lineare a doppia elica, un capsidico icosaedrico con diametro di circa 100 nm, costituito da 162 capsomeri (figura 1). Il capsidico è circondato da un materiale elettrondenso, di natura proteica chiamato tegumento o matrice, racchiuso a sua volta da un doppio strato lipidico detto envelope. Quest'ultimo si origina dalla membrana plasmatica cellulare o dell'apparato del Golgi della cellula ospite, presenta diverse glicoproteine virali, (15). Il diametro dei virioni maturi di CMV può variare tra 150 e 200nm a causa del diverso spessore della matrice.

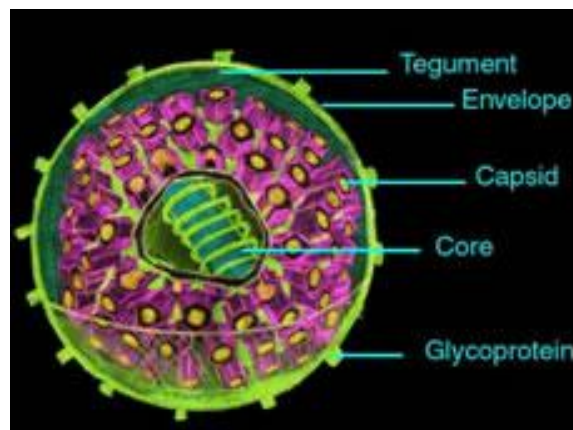


Figura 2.1: Cytomegalovirus.

Il CMV è sensibile a pH acido, ai solventi dei lipidi e al calore. A 37°C ha vita media di circa 1 ora (in ambiente extracellulare), (16).

Le cellule infettate da CMV possono rilasciare tre diversi tipi di particelle: i virioni infettivi, le particelle non infettive (NIEP) e i corpi densi (DB) (17), (figura 2).

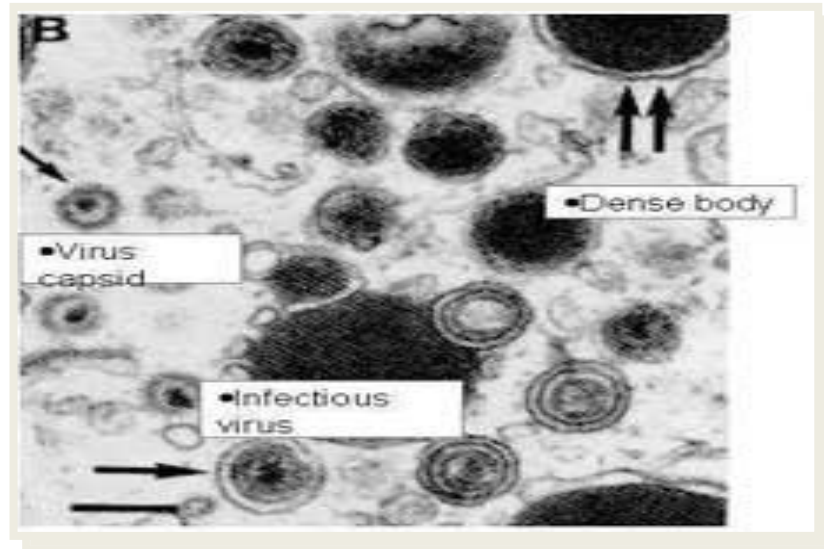


Figura 2.2: Virioni infettivi, corpi densi e virioni non infettivi.

I DB sono prodotti in quantità pari a quella dei virioni maturi, sono di grandi dimensioni, mancano completamente del nucleocapside e del DNA virale. Abbondano nel citoplasma delle cellule infette, sono avvolti dall'envelope e sono ricchi di una proteina del tegumento: la pp65.

Le NIEP sono prodotte in quantità molto minore e si distinguono dai virioni maturi solo per la mancanza del DNA. Sia NIEP che DB hanno un involucro uguale a quello del virione e sono quindi in grado di penetrare nella cellula, ma non di replicarsi, data la mancanza del materiale genetico.

2.3 Il genoma di CMV

Il DNA degli Herpesvirus è a doppia elica, lineare. Circolarizza però quando viene rilasciato nel nucleo della cellula ospite.

Il genoma di CMV è il più vasto tra quelli degli Herpesvirus, infatti è lungo mediamente 240 Kbp (CMV umano) (18). È costituito da due sequenze uniche, U_L e U_S , di lunghezza

maggiore la prima e più breve la seconda, alle estremità delle quali sono localizzate alcune sequenze ripetute (figura 3).

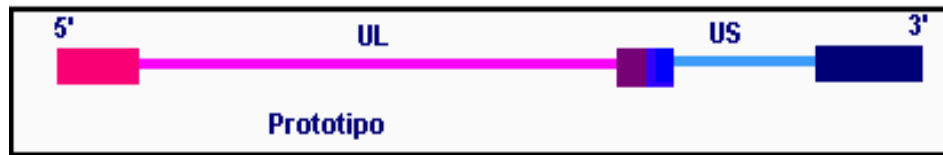


Figura2.3: Genoma di CMV

“a” è una sequenza ripetuta con orientamento diretto alle estremità del genoma. Può essere presente in singola copia o in un numero imprecisato di ripetizioni, indicate col simbolo “a_n”.

È presente anche al punto di congiunzione delle due sequenze uniche, ma con orientamento inverso. Anche in questo caso può essere amplificata ed è indicata come a_m' dove m indica il numero di copie (19).

“b” è una sequenza unica presente con orientamento inverso alle estremità della regione U_L.

“c” è anch'essa una ripetizione inversa in unica copia alle estremità di U_S.

La presenza di sequenze ripetute alle estremità del genoma permette a CMV di circolarizzare quando penetra nel nucleo della cellula ospite, o di ricombinare dando origine a quattro isomeri lineari: prototipo (P), inversione della componente U_S (I_S), inversione della componente U_L (I_L), inversione di entrambe le componenti (I_{LS}). Tra i CMV solo quello umano genera queste inversioni perché è l'unico ad avere tale struttura genomica, detta di classe E (20).

I siti di taglio ed impaccamento sono localizzati a livello della sequenza “a” (21).

Quest'ultima contiene anche due sequenze che sono conservate nelle regioni terminali dei genomi degli Herpesvirus: pac1 e pac 2 (22).

Il completo sequenziamento del genoma di AD169 ha permesso di individuare 208 open readingframes (ORFs) che codificano per proteine di lunghezza maggiore di 100 aminoacidi (23). Circa il 15% di esse ha sequenze simili a quelle di altri Herpesvirus che codificano per proteine strutturali o con un ruolo importante a livello regolativo (24).

Nel genoma di CMV spesso si sono viste sequenze cellulari integrate, probabilmente per ricombinazione aspecifica, fenomeno tipico dei DNA ricchi in GC o con ripetizioni di coppie di nucleotidi (25).

2.4 Il ciclo vitale di CMV

Il ciclo vitale di CMV comprende sei fasi diverse: adsorbimento, penetrazione, svestimento, sintesi, assemblaggio e fuoriuscita.

L'adsorbimento avviene per adesione del virus alla superficie della cellula ospite mediante un meccanismo ligando-recettore. Ancora non si conosce l'intimo meccanismo, ma si sa che sulla superficie del virus è presente un recettore in grado di legarsi alla β_2 microglobulina di classe I presente sulla superficie della cellula ospite (26).

In questa fase non è ancora evidente la caratteristica ristrettezza dello spettro d'ospite; infatti il virus può accedere ad un numero di cellule molto maggiore di quello in cui può portare a termine la replicazione. Ciò avviene probabilmente perché la ristrettezza d'ospite è generata da un blocco dell'espressione del genoma virale in una fase successiva (27).

Recentemente sono stati individuati due recettori cellulari di natura glicoproteica (gp30 e gp92) presenti in numero elevato su fibroblasti e cellule endoteliali umane (permissive per CMV) con cui sembrerebbero interagire le glicoproteine virali gB e gH (28).

Tra adsorbimento e penetrazione c'è un intervallo di circa 5 minuti. Sembra che il virus attraversi la membrana citoplasmatica con un meccanismo di fusione dell'envelope col plasmalemma stesso piuttosto che per endocitosi (29).

Una volta penetrati nel citoplasma, si ha la fase dello svestimento durante il quale i virioni rilasciano il proprio materiale genetico che migra nel nucleo della cellula ospite dove avvengono la replicazione virale e la formazione di nuovi virioni.

Questi ultimi passano nel citoplasma con i capsidi nudi, che possono essere estrusi nello spazio extracellulare per gemmazione del plasmalemma o venire internalizzati in vacuoli originati dall'apparato del Golgi che vengono poi riversati all'esterno della cellula (figura

4).

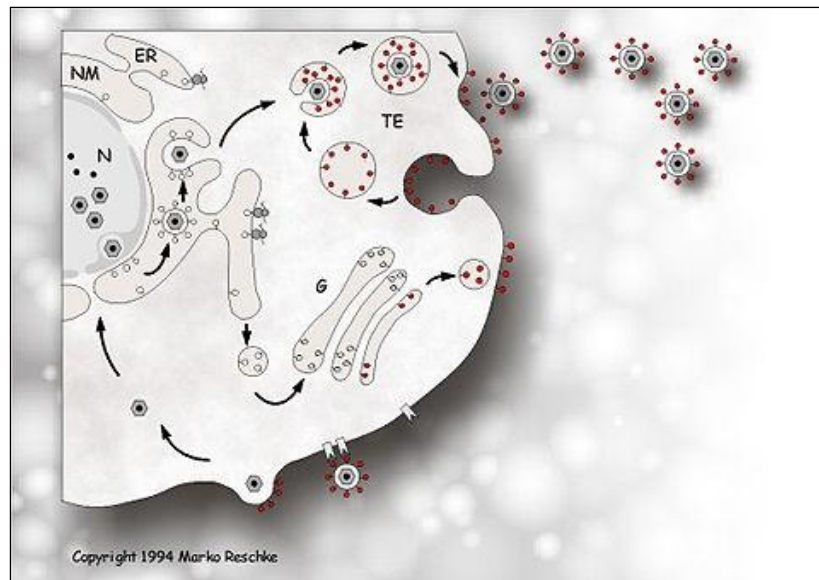


Figura 2.4: Ciclo vitale di CMV.

2.5 *Trascrizione*

L'espressione genica di CMV avviene a spese dei meccanismi trascrizionali tradizionali della cellula ospite. Non è mai stata individuata infatti nessuna RNA-polimerasi virale associata al virione o nelle cellule infette.

L'enzima deputato alla trascrizione del genoma virale è dunque la RNA-polimerasi II della cellula ospite.

Nel CMV si possono distinguere tre classi di geni: i geni α o geni precocissimi (IE), i geni β o geni precoci (E) e i geni γ o geni tardivi (L), così detti per la distribuzione temporale della loro espressione (30).

I geni più precoci codificano per proteine con attività di controllo sui geni più tardivi, generando così un meccanismo di regolazione a cascata.

Il ciclo replicativo di CMV è lento: sono necessarie 48-72 ore prima di poter evidenziare la progenie virale. La causa di ciò è il tempo richiesto per l'attivazione dei geni β , la cui trascrizione comincia dopo 24-36 ore dall'inizio dell'infezione (31). I prodotti dei geni di classe α invece, sono già presenti dopo 20-30 minuti dall'ingresso del virus nella cellula.

Spesso i tempi di attivazione delle diverse classi di geni non sono ben definiti: a causa di meccanismi di regolazione post-trascrizionale alcuni mRNA trascritti precocemente possono essere tradotti solo dopo la comparsa di proteine tardive.

2.6 Le proteine

Il genoma virale è sufficientemente ampio per codificare oltre 80 proteine, le quali sono distinte in strutturali e non strutturali. Le proteine precocissime (IE) e precoci (E) precedono la sintesi del DNA e sono considerate non strutturali; le proteine tardive (L) vengono invece prodotte dopo la sintesi del DNA e sono considerate strutturali.

In ogni caso, questa distinzione non risulta essere totalmente netta, infatti alcune proteine tardive vengono trascritte e tradotte, anche se in percentuale ridotta, prima della sintesi del DNA mentre alcune tra quelle precoci e precocissime persistono anche durante la fase tardiva della replicazione virale. E' dunque complicato stabilire se la proteina in esame sia

il prodotto di una prolungata trascrizione del DNA parentale, oppure della sintesi ex novo di proteine a partire dal DNA della progenie virale.

Per l'instaurarsi dell'infezione virale, sono molto importanti le proteine IE; sono proteine fosforilate con peso molecolare vario a seconda del ceppo virale a cui appartengono e sono in grado di legare il DNA, causando così dei danni alla cromatina della cellula ospite.

La principale proteina codificata dal gene IE1 del peso molecolare di 62-78 Kd e costituita da 491 aminoacidi, è la p72. Si tratta di una proteina molto fosforilata, ricca in glutammato ed aspartato in corrispondenza della regione carbossi-terminale. E' rilevabile nelle cellule infette entro un'ora dall'ingresso del virus citomegalico; dapprima si accumula nelle membrane del reticolo endoplasmatico granulare dove viene fosforilata prima di essere trasportata nel nucleo della cellula. Giunta nel nucleo la p72 instaura dei legami con il DNA virale portando all'aumento della trascrizione dei geni codificanti per le proteine precocissime; è quindi una proteina indispensabile per la replicazione virale.

Le proteine E sono circa 25 e comprendono fosfoproteine, glicoproteine ed enzimi essenziali per la successiva replicazione del DNA virale. Una di queste è la DNA-polimerasi virale, senza cui non sarebbe possibile la trascrizione, la pp65 (lowermatrixprotein), proteina strutturale con attività proteinchinasi localizzata nella matrice interna dei "dense bodies" che compare nella fase precoce dell'infezione. La presenza di anticorpi contro questa proteina nel siero di un paziente è spesso sintomo di un'infezione da CMV in corso.

Le proteine L, codificate dai geni tardivi, sono in genere proteine strutturali, che vengono sintetizzate dopo la replicazione del DNA virale. Attualmente se ne conoscono 55, di cui 23 fosforilate e 32 glicosilate con peso molecolare che varia dagli 11 ai 200 Kd; sono distribuite nel nucleo capsidi, nel tegumento e nel pericapside. Tra di esse rivestono

notevole importanza la proteina capsidica maggiore (p150) e la proteina basica fosforilata nel tegumento (BPP), entrambe con peso molecolare di circa 150 Kd. Un'altra proteina da segnalare è la p28, altamente fosforilata e localizzata nel capsido del virione maturo: si tratta di un buon immunogeno, ma solo per le IgG.

Di particolare interesse è poi una proteina capsidica del peso molecolare di 38Kd (p38), presente solo nei capsidi privi di DNA e non nelle particelle virali mature: interviene probabilmente nel processo di assemblaggio tra genoma e capsido vuoto per poi essere eliminata.

Tra le glicoproteine del pericapsido vanno ricordate la gp116 e la gp58, legate tra loro da ponti disolfurici e codificate dal gene gB, altamente conservato in tutti i sottogruppi della famiglia Herpesviridae.

La maggior parte delle proteine strutturali è immunogena durante l'infezione in vivo (32). Le IgM anti-CMV vengono prodotte contro gli antigeni p150 e p65, le IgG contro la p28. Non esistono prove della produzione di IgM dirette contro proteine non strutturali.

2.7 Patologia e patogenesi

Il CMV penetra nell'organismo per contatto delle mucose con secrezioni o liquidi organici infetti oppure attraverso trasfusioni di sangue o trapianto d'organo; inizia quindi a replicarsi nelle cellule epiteliali nel primo caso, nei monociti e nei macrofagi nel secondo. All'infezione fa seguito il coinvolgimento dell'organo o del tessuto con invasione cruciale delle cellule endoteliali vascolari, nelle quali il virus si replica attivamente. Esse diventano un vero e proprio serbatoio di diffusione del CMV, che viene da qui riversato nel torrente circolatorio; a questo punto il virus può essere fagocitato dai leucociti polimorfonucleati oppure penetrare nei monociti. Si tratta di cellule semi-permissive in cui si può instaurare

l'infezione latente o, nel caso di ospiti immunocompromessi, da cui può iniziare la diffusione sistemica con il coinvolgimento di nuovi organi e tessuti.

Il CMV è dotato di scarsa patogenicità, per questo le infezioni sono spesso asintomatiche. E' tuttavia un agente citolitico, che può produrre distruzione del tessuto provocando una risposta infiammatoria, che contribuisce ulteriormente alla disfunzione dell'organo (33). L'infezione persistente si verifica perchè il virus riesce ad evadere le difese immunitarie, in particolare di tipo umorale, legando la α 2-microglobulina dell'ospite al momento dell'uscita dalla cellula. Un altro meccanismo che ha il CMV per evadere le difese immunitarie è l'induzione sulla cellula ospite di una glicoproteina che lega il frammento Fc immunoglobulinico; è probabile che il legame non specifico delle IgG alle cellule infettate le protegga dalla lisi immune ad opera del complemento e dalle cellule T citotossiche (34).

Una delle risposte del sistema umorale dell'ospite nei confronti del CMV è la produzione di anticorpi neutralizzanti, che si ritiene riconoscano le glicoproteine virali gB e gH, responsabili della capacità del virus di penetrare in cellula. Essi compaiono nel siero dopo circa 13 settimane dall'inizio dell'infezione. Tuttavia il CMV nei liquidi organici è spesso combinato alla β 2-microglobulina, e questo legame potrebbe spiegare le difficoltà di una completa neutralizzazione del virus da parte questi anticorpi specifici.

Il CMV non dà immunità completa alle reinfezioni, per cui è possibile subirne ad opera di ceppi differenti (35).

L'equilibrio che s'instaura tra CMV e sistema immunitario e che è alla base delle infezioni latenti e persistenti viene meno nel caso di deficit immunitari, ben evidenti in soggetti affetti da AIDS e in pazienti sottoposti a trapianto d'organo, nei quali il CMV può replicarsi attivamente in organi come polmoni, reni, fegato, retina, cervello, ghiandole

surrenali, miocardio e tratto gastro-intestinale, nonché essere eliminato con saliva, urina, latte, sperma e secrezioni vaginali (figura 5).

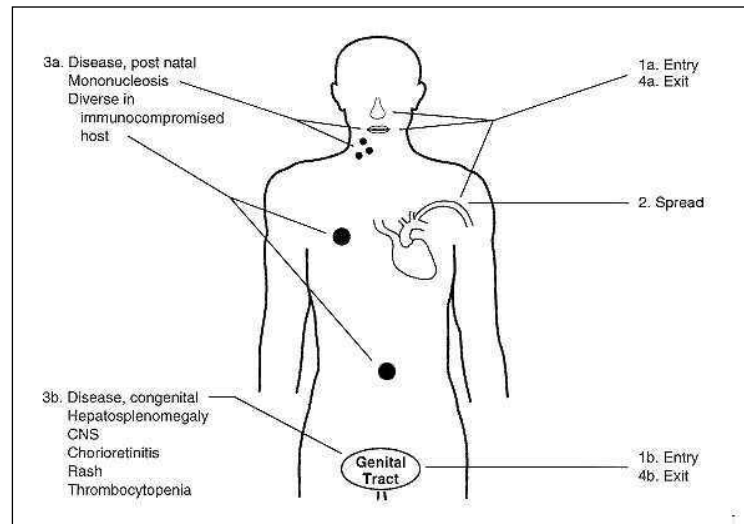


Figura 2.5: Ingresso ed uscita del CMV

In questi soggetti il virus provoca importanti situazioni cliniche che includono polmonite fulminante nel caso di trapianti di midollo, malattie gastro-intestinali, corioretinite, esofagite, necrosi delle ghiandole surrenali, encefalite sub-acuta.

Nei pazienti con AIDS si può generare un'infezione diffusa mortale, anche se le recenti terapie, a cui questi soggetti vengono sottoposti, controllano egregiamente i patogeni opportunisti tra cui il CMV.

Va altresì ricordato che l'infezione da CMV può essere essa stessa immunosoppressiva, a causa della replicazione virale in cellule stromali del midollo con conseguente deficienza nella rigenerazione delle cellule staminali, in particolare nei precursori della linea granulocitica. Questo predispone il soggetto ad infezioni secondarie batteriche o fungine (36).

La modalità con cui il CMV può creare immunodepressione non è ancora stata chiarita, anche se in vivo si è dimostrato che una piccola parte di linfociti e monociti viene infettata.

Da non sottovalutare sono i segnali di autoimmunità che compaiono durante una infezione primaria da Citomegalovirus, i quali possono far considerare il CMV responsabile dell'insorgenza del diabete insulino-dipendente nei casi di infezione congenita. E' stato recentemente dimostrato che in circa il 20% dei casi di diabete mellito è evidenziabile un'infezione persistente da CMV accompagnata dalla comparsa di autoanticorpi specifici per una proteina di peso molecolare 38Kd presente nelle cellule β delle isole di Langherans e che anticorpi monoclonali diretti contro la stessa proteina si sono ottenuti dopo immunizzazione di topi con CMV. Questi dati farebbero pensare ad una cross reattività antigenica tra una proteina di CMV ancora da identificare e la proteina delle cellule β . Inoltre nel 20% dei casi di mononucleosi da CMV si osservano autoanticorpi contro i globuli rossi; si e' dimostrato che la proteina p38, che fa parte della struttura delle particelle virali, abbia al suo estremo carbossilico un epitopo in comune con una normale componente delle membrane delle cellule non infettate, di peso 60Kd. Questo antigene è abbondantemente presente sulla superficie dei globuli rossi e potrebbe giustificare la frequente comparsa di anemia emolitica nel corso della infezione primaria da CMV (37). Nell'ambito dell'autoimmunità è anche da collocare l'induzione da parte del CMV di una transitoria ipergammaglobulinemia, dovuta ad una attivazione policlonale dei linfociti B con una produzione non specifica di IgG.

Nel neonato congenitamente infetto la sintomatologia (presente nel 10% dei casi) comprende danni neurologici, ematologici e di sviluppo; la sequela più comune sia tra i bambini sintomatici alla nascita sia tra gli asintomatici è la sordità neurosensoriale. L'associazione tra infezione congenita da CMV e sordità neurosensoriale è stata studiata da vari autori. Secondo Bonfils (37) il 3% dei casi di sordità infantile è dato da un'infezione congenita da CMV; secondo Sculerati (38) questa quota sarebbe pari al 2%.

D'altra parte in uno studio di Fowler (39) condotto sui neonati con infezione congenita da CMV e' riportato che il 15,4% di essi va incontro a sordità entro il sesto anno di età.

2.8 Epidemiologia

L'infezione da CMV è endemica ed ubiquitaria e non risente di variazioni stagionali. Nel corso dell'esistenza dal 40% all'80% degli individui dei paesi industrializzati e quasi la totalità dei Paesi in via di sviluppo va incontro a infezioni da CMV, che normalmente evolve senza sintomi morbosi e si traduce in un'infezione latente con persistenza del genoma virale in alcune sedi cellulari (monociti, epitelio dei tubuli renali, epitelio delle ghiandole salivari etc.). La patologia citomegalica non è, quindi, correlata a particolari situazioni climatiche, mentre fattori socio-economici ne possono determinare l'incremento o la diminuzione.

La trasmissione del CMV avviene per contatto interumano diretto o indiretto, tenendo presente che il virus si trova in materiali biologici quali: urina, sangue, feci, sperma, secrezioni cervico-vaginali e oro-faringee.

Il propagarsi dell'infezione è determinato in gran parte dalla prolungata eliminazione del virus da parte dell'organismo, ma anche dal fatto che l'infezione nella maggior parte dei casi è in forma asintomatica, quindi non riconosciuta dall'individuo che continua a sostenere una vita "normale". Nel corso della prima infanzia il contatto con il virus può avvenire principalmente per via orale o respiratoria; in particolare entro il primo anno di vita la fonte di contagio è la madre, mentre da uno a tre anni l'esposizione al virus può avvenire a casa o negli asili nido. Non è da sottovalutare il fatto che anche le trasfusioni di sangue possono determinare infezioni primarie o ricorrenti; per far fronte a questo

problema, è aumentato l'impiego di sangue arricchito di emazie, ma povero di leucociti, riducendo così il rischio di contagio da CMV (40).

Le infezioni si traducono in malattia soprattutto se l'infecto ha ridotte difese immunitarie. È il caso dei soggetti infettati da HIV, con malattie debilitanti, sottoposti a trapianti d'organo o di midollo, nei quali oltre alle normali modalità di trasmissione giocano un ruolo importante anche il tipo di organo trapiantato ed il sangue trasfuso.

Si possono avere infezioni ricorrenti. Infatti dopo un'infezione primaria si può stabilire una lieve infezione cronica in cui l'eliminazione virale periodicamente raggiunge livelli consistenti. Inoltre soggetti immuni possono reinfettarsi perché venuti a contatto con ceppi di CMV diversi dal punto di vista genetico ed antigenico. Infine il CMV può restare latente in diversi organi dopo l'infezione primaria e riattivarsi nel corso della vita in seguito a differenti stimoli. Nel caso delle donne gravide studi epidemiologici, condotti con l'ausilio di tecniche di biologia molecolare, hanno evidenziato che la riattivazione e la persistenza del virus sono eventi più comuni rispetto alla reinfezione (41). Tuttavia la reinfezione attraverso le mucose del tratto genitale è relativamente comune in condizioni di promiscuità sessuale (42)

Uno studio delle infezioni ricorrenti, come quelle primarie, condotto sulla popolazione femminile ha dimostrato che l'eliminazione del virus avviene con la secrezione cervicale nel 3-18% dei casi, con l'urina nel 3-9% e con le secrezioni oro-faringee in 1-2% (43).

Circa il 30% delle donne sieropositive può eliminare in modo intermittente il CMV attraverso l'allattamento durante il primo anno postparto, più frequentemente tra il secondo e il quarto mese di vita del neonato (44). Durante la gravidanza anche l'età gestazionale sembra influenzare l'eliminazione virale del tratto genitale che passa da 1,5% nel primo trimestre a 13,5% verso il termine (45).

2.9 Epidemiologia delle infezioni congenite

L'infezione congenita da CMV è certamente molto comune nell'uomo: negli Stati Uniti si verifica in circa 35000 bambini annualmente. Mediamente lo 0,2-2,4% dei nati vivi viene infettato in utero in seguito al passaggio diaplacentare del virus. Di questi oltre il 10% evidenzia una tipica CID (Cytomegalic inclusion disease) generalizzata, con sintomi più o meno gravi alla nascita (tabella 1).

- ritardo di crescita	- calcificazioni intracraniche
- ittero	- corioretiniti
- epatosplenomegalia	- sordità neurosensoriale
- trombocitopenia	- dilatazione ventricolare (*)
- petecchie	- anemia emolitica (*)
- polmonite	- epatite cronica (*)
- microcefalia	- ascite (*)

Tabella.2.1 – Principali sintomi alla nascita di bambini infetti congenitamente. (*): rare segnalazioni

Circa il 90% dei neonati con infezione congenita risulta essere asintomatico; di questi, però, una percentuale valutabile tra il 15-17% manifesterà sequele tardive nel corso dell'infanzia, quali sordità e disturbi neurologici.

All'indagine di laboratorio è possibile rilevare un aumento delle IgM, sia seriche (>20 mg/dl) che nel sangue del cordone ombelicale, linfocitosi atipica, incremento delle transaminasi (>80 U/l), trombocitopenia (>100000/mm³), iperbilirubina diretta (>2 mg/dl) ed aumento delle proteine liquorali (>120 mg/dl).

Studi sieroepidemiologici hanno evidenziato che la prevalenza anticorpale verso il CMV è influenzata dall'età, dall'area geografica e dalle condizioni culturali, socioeconomiche ed educative. Nei Paesi sviluppati la prevalenza anticorpale è del 40-60% negli adulti di stato socio economico medio-alto, mentre sale all'80% in quelli di stato socioeconomico basso (46). Nei Paesi in via di sviluppo l'80% dei bambini già all'età di tre anni possiede anticorpi anti-CMV (47).

Lavori recenti hanno sottolineato una certa relazione tra prevalenza anticorpale materna e frequenza dell'infezione congenita, nel senso che è maggiore il numero delle infezioni congenite, anche se prive di manifestazioni cliniche, nelle popolazioni con alta sieroprevalenza rispetto a quelle con bassa sieroprevalenza. La presenza di anticorpi IgG e IgM anti-CMV nel primo trimestre di gravidanza viene solitamente considerata come segno di infezione materna primaria, anche se non esclude un'infezione verificatasi nelle settimane immediatamente precedenti il concepimento. Invece si parla di infezione ricorrente, nella forma di riattivazione o di reinfezione, quando, malgrado la presenza di anticorpi materni IgG anti-CMV prima del concepimento, si ha un'infezione congenita.

In generale nella popolazione sono state rilevate frequenze di sieroconversione durante la gravidanza dello 0,7-4,1% con trasmissione dell'infezione citomegalica al feto nel 25-75% dei casi (48). In diversi studi si è sottolineato che non c'è una chiara relazione tra il momento dell'infezione materna primaria e l'entità dei danni che il feto subirà, anche se alcuni ricercatori ritengono più pericolose per lo sviluppo del feto le infezioni nella prima metà della gravidanza (49). Per le infezioni materne ricorrenti la possibilità di trasmettere l'infezione al feto varia dallo 0,2 al 1,8%. Eppure, nelle popolazioni con alta prevalenza di anticorpi verso il CMV, il fenomeno della ricorrenza rende ragione del maggior numero di infezioni congenite. In questi casi la trasmissione intrauterina dell'infezione, malgrado una

certa copertura anticorporeale, è principalmente dovuta alla riattivazione del ceppo virale endogeno, com'è stato dimostrato da studi di analisi molecolare (50). Tuttavia si può verificare anche una reinfezione della madre e del feto con un nuovo stipo di CMV. Benché non impediscano la trasmissione di CMV al feto, gli anticorpi materni sono in grado di ridurre sintomi e sequele (51). Infatti solo un piccolo numero di neonati sintomatici si sono avuti da madri sieropositive prima della gravidanza, per lo più immunocompromesse o con un'infezione primaria acquisita in un periodo estremamente vicino al tempo del concepimento.

Le sequele osservate nei bambini congenitamente infetti sono correlate alla presenza o meno di sintomi alla nascita; infatti la maggior parte dei soggetti sintomatici potrà andare incontro a morte (10-20%), riduzione dell'udito (50%), corioretinite (20%), disturbi neurologici (70%) e fragilità dei denti (30-40%). Al contrario solo il pochi tra i neonati asintomatici svilupperà sequele, quali riduzioni dell'udito e disturbi neurologici (52).

Molti ricercatori hanno dimostrato che l'eliminazione virale con secrezioni corporee durante e dopo il parto è responsabile di infezioni perinatali e postnatali. In particolare sia l'ingestione delle secrezioni cervico-vaginali che l'assunzione di latte materno, entrambe infettate da CMV, costituiscono un'importante via di trasmissione del virus al neonato. Le infezioni perinatali e postnatali determinano principalmente disturbi a livello polmonare e del sistema reticolo-endoteliale, ma non producono sequele neurologiche.

2.10 Terapia delle infezioni da CMV

Mentre nei soggetti con normale funzionalità del sistema immunitario non è necessario un trattamento specifico, in quelli immunodepressi, con gravi infezioni da CMV, il farmaco più indicato in terapia è 9-(1,3diidrossi-2-propossimetil)guanina (Ganciclovir) (53).

Il Ganciclovir è un nucleoside analogo della timidina, strutturalmente simile all'Acyclovir, attivo verso tutti gli Herpesvirus, in particolare verso il CMV, stabilizzandone l'infezione. Il meccanismo d'azione non è ben chiaro sebbene il derivato trifosfato funziona da inibitore e substrato della DNA-polimerasi del CMV. A differenza di altri analoghi glicosilici con struttura simile, come l'Acyclovir, il Ganciclovir presenta un gruppo idrossilico in posizione 3' sull'anello del ribosio e viene incorporato nel DNA sia virale che quello della cellula ospite, risultando così dannoso soprattutto per i tessuti a rapida proliferazione quali midollo osseo ed il tratto gastrointestinale (54).

La cura con Ganciclovir consiste dapprima in una terapia d'attacco (prime due settimane) e successivamente in una terapia di mantenimento, da proseguire in alcuni casi per tutta la vita del paziente. Nel caso di corio retinite da CMV il Ganciclovir viene somministrato per via endovenosa attuando al solito una terapia d'attacco seguita da una di mantenimento. Tale farmaco però non è esente da effetti collaterali in quanto causa neutropenia e trombocitopenia.

Altro farmaco attivo nei confronti del CMV è il fosfonoformato trisodico (Foscarnet) che è un inibitore competitivo della DNA-polimerasi virale. Esso però causa, nei pazienti trattati, una grave iperazotemia che ne limita l'uso.

Va preso in considerazione anche l'Acyclovir che, malgrado sia poco efficace nel caso di gravi infezioni da CMV, è molto utile nella profilassi in quanto riduce il rischio di infezione primaria e di riattivazione di una infezione latente nei soggetti immunocompromessi.

L'Acyclovir è una 9-(idrossietossimetil)guanina, un analogo aciclico della desossiguanosina, costituente del DNA, nel quale la molecola ciclica del desossiribosio è stata sostituita da una catena laterale aciclica. È importante sottolineare che solo la DNA-

polimerasi virale, e non quella cellulare, è in grado di “accettare” l’Acyclovir al posto della desossiguanosina come substrato per la sintesi del DNA virale.

Il risultato è che la sintesi viene attivata ma poi si arresta in seguito all’inibizione della DNA-polimerasi virale. E’ altresì importante sottolineare come l’Acyclovir si concentri maggiormente nelle cellule infette che contengono un enzima, la Timidina-chinasi virale, tipico degli Herpesvirus. Tale enzima è necessario per la fosforilazione dell’Acyclovir, processo inevitabile perché possa essere incorporato nel DNA virale (55).

Sempre a scopo profilattico risultati incoraggianti sono stati ottenuti con la somministrazione di immunoglobuline specifiche iperimmuni.

Bisogna comunque sottolineare l’esistenza di ceppi resistenti sia a Ganciclovir che ad Acyclovir in pazienti affetti da AIDS, per cui è necessario disporre in futuro di altri agenti antivirali (31,57).

2.11 Profilassi delle infezioni da CMV

Poiché allo stato attuale non sono ancora disponibili vaccini efficaci e sicuri, le misure profilattiche attuate per proteggere i soggetti a rischio (immunodepressi, donne in età fertile) dall’infezione di CMV si basano sull’utilizzo di farmaci antivirali e di immunoglobuline, o sull’impiego di particolari strategie che permettono di evitare la trasmissione dell’infezione attraverso sangue o organi trapiantati.

Per esempio a scopo profilattico vengono somministrate immunoglobuline specifiche, generalmente in associazione con DHPG, soprattutto nella prevenzione di patologie come le polmoniti da CMV nei trapianti di midollo.

L’utilizzo di sangue da donatori sieronegativi è stato per lungo tempo l’unico mezzo per limitare il rischio di infezione, tuttavia la limitata disponibilità di sangue proveniente da

soggetti sieronegativi ha portato ad un crescente interesse per lo sviluppo di metodi che possano ridurre l'infettività del sangue di soggetti sieropositivi.

E' stata ormai documentata l'efficacia della filtrazione del sangue (58): vengono utilizzati gel polimerici ai quali i leucociti aderiscono selettivamente ottenendo una deplezione leucocitaria del 99%. In questo modo un numero estremamente limitato di pazienti contrae l'infezione. Un caso particolare è costituito dai bambini prematuri nati da madre sieronegativa e trasfusi con sangue proveniente da donatori sieropositivi. Poiché in questi bambini si hanno forme d'infezione particolarmente gravi, è ormai generalmente accettato l'uso di sangue proveniente da donatori sieronegativi e, in generale, si riserva sangue CMV-negativo a neonati con età gestazionale inferiore alle 32 settimane.

I metodi per prevenire l'infezione in pazienti trapiantati comprendono l'impiego di organi, sangue ed emoderivati provenienti da soggetti sieronegativi per CMV o, se questo non è possibile per la scarsità di donatori, trattati in modo da ridurre il rischio di trasmissione dell'infezione.

Un passo avanti fondamentale nella profilassi dell'infezione da CMV è rappresentato dall'immunizzazione attiva. Numerosi studi sono stati condotti fino ad oggi, ma nessun preparato è attualmente disponibile. Fino ad ora sono stati sperimentati vaccini vivi attenuati con i ceppi AD169 e Towne, ma con scarso successo; sono attualmente in studio vaccini a sub unità ricombinanti. Il problema principale rimane comunque l'enorme numero di ceppi di CMV differenti e quindi il rischio di fornire un'immunità incompleta.

2.11.a Vaccini a virus vivo

I primi a porre attenzione all'immunizzazione contro CMV sono stati due gruppi di ricercatori, a Londra (44; 45) e a Philadelphia (46), nel 1970. Il gruppo di Londra ha

sperimentato un vaccino ottenuto dal ceppo AD169, mentre il gruppo di Philadelphia ha condotto uno studio utilizzando il ceppo Towne. In entrambi i casi si trattava di vaccini a virus vivo attenuato che inducevano siero conversione nei vaccinati tramite iniezione sottocutanea ed effetti collaterali, locali e sistemici, lievi e tollerabili.

I primi trials clinici col vaccino Towne sono stati condotti su giovani adulti volontari sani di sesso maschile (47). I primi risultati, confermati poi dalla sperimentazione su più volontari di entrambi i sessi (48), mostravano che l'iniezione era ben tollerata, provocando eventualmente eritema e gonfiore locali, e che l'andamento della risposta era paragonabile a quella che si ha dopo l'infezione naturale, anche se i titoli anticorpali erano più bassi; in particolare anticorpi neutralizzanti comparivano generalmente 4 settimane dopo la vaccinazione, una proliferazione linfocitaria era evidente dopo 1-2 settimane e si assisteva alla comparsa di linfociti CD8+ citotossici che però, a differenza di quanto avviene nell'infezione naturale, tendevano a scomparire a distanza di un anno dalla vaccinazione (59; 60).

Poiché i trapiantati di rene sono tra i soggetti maggiormente interessati dalla malattia di CMV, sono anche stati organizzati studi per valutare la capacità del vaccino, preparato col ceppo Towne per prevenire la malattia e la sua sicurezza in soggetti immunocompromessi (61).

I trapiantati di rene ricevevano il vaccino Towne o il placebo ed erano poi seguiti dopo il trapianto per valutare la comparsa di un'infezione la comparsa di un'infezione o della malattia. E' stata osservata la comparsa di un'infezione da parte del ceppo del donatore sieropositivo in riceventi sieropositivi, ma senza conseguenze gravi (62).

I risultati hanno evidenziato che il vaccino Towne non preveniva l'infezione da CMV, ma attenuava la gravità della malattia; infatti si era ottenuta una riduzione dei casi gravi di circa l'80%.

Da quanto esposto sopra si può concludere che il vaccino Towne ha un effetto immunogeno moderato, l'immunità indotta infatti non è valida come quella che si ha dopo l'infezione naturale.

Wang (63) ha ipotizzato che i livelli di anticorpi neutralizzanti potrebbero aumentare con dosi più elevate di vaccino. Sono stati eseguiti studi in questo senso, ma non si è osservato nessun caso di miglioramento della risposta immunitaria.

Un altro studio è stato condotto usando un ceppo chiamata Toledo (64) iniettato dopo un basso numero di passaggi in coltura tissutale. Al quinto passaggio l'iniezione sottocutanea del vaccino Toledo provocava segni di infezione, quali febbre, aumento degli enzimi epatici e riduzione del numero delle piastrine. La sintomatologia compariva dopo 4-5 settimane dall'iniezione e si risolveva spontaneamente. Il vaccino è stato testato su donne volontarie sane, delle quali era noto lo stato sierologico. Alcune tra le donne sieronegative hanno ricevuto il vaccino Towne circa un anno prima della prova. Le volontarie non vaccinate sieronegative hanno sviluppato l'infezione dopo la somministrazione di 10-100 PFU (unità formanti placca) di vaccino; le volontarie sieropositive sono invece risultate resistenti a questa dose di vaccino, ma la metà si è ammalata dopo la somministrazione di 1000 PFU. I soggetti sieronegativi precedentemente vaccinati con Towne hanno mostrato resistenza alle dosi basse di vaccino ma suscettibilità maggiore rispetto al gruppo con immunità naturale.

Nuovi vaccini sono stati messi a punto e sono attualmente in corso di sperimentazione. Il vaccino Towne è stato ottenuto utilizzando pools di virus. Un nuovo studio è stato lanciato

con un pool più immunogeno di quelli precedentemente sperimentati(60), per valutare se i maggiori titoli anticorpali indotti da questo vaccino comportano una maggior efficacia protettiva. Nel vaccino Towne c'è una delezione nel DNA di 13kb: è stato ipotizzato che i geni di questa regione contribuiscano alla virulenza e all'immunogenicità di CMV e che la reintegrazione di tutti o alcuni di questi geni possa produrre un vaccino immunogeno (65). I trials clinici stabiliranno se un corretto bilancio fra immunogenicità e sicurezza può essere raggiunto.

2.11.b Vaccini a sub unità

La produzione di almeno la metà della quota di anticorpi neutralizzanti che si generano nel corso di un'infezione da CMV è dovuta alla proteina gB (66; 67).

Sono stati condotti trials clinici su adulti sani (68) e bambini (69), utilizzando un vaccino ottenuto con gB, che hanno confermato una buona immunogenicità in entrambi i gruppi. I livelli di anticorpi neutralizzanti però diminuivano rapidamente durante i 6 mesi successivi alla terza dose; è stata perciò somministrata una quarta dose ed è stata ottenuta una risposta maggiormente persistente. I risultati definitivi comunque non sono ancora disponibili.

Un altro studio attualmente in atto è condotto su una popolazione di madri con basso livello socio-economico, cui corrisponde un'elevata circolazione del virus. Ciascuna donna ha ricevuto il vaccino gB dopo la prima gravidanza e sarà seguita fino alla gravidanza successiva. Il secondo figlio sarà indagato alla nascita per la presenza di infezione congenita.

2.11.c Vaccini ricombinanti

I poxvirus sono noti per la loro capacità di indurre una risposta immune (70), cui fa riscontro però la proprietà di replicarsi in maniera incontrollata nei soggetti immunodepressi. È stato studiato l'utilizzo di poxvirusavium come alternativa; il canaripox, infatti, non si replica nelle cellule dei mammiferi, comportando quindi una notevole sicurezza (71).

Sono stati creati vaccini ricombinanti canaripox-gB e si è osservato che la risposta anticorpale nell'uomo permaneva solo una settimana dopo la seconda o terza dose. Una risposta più duratura è stata ottenuta somministrando, insieme al virus ricombinante, il Towne attenuato (72).

Del canaripox è stata studiata anche la capacità di indurre l'immunità cellulare, con produzione soprattutto di linfociti T citotossici (CTL). Diversi Autori (73; 74; 75) hanno confermato che i principali stimolatori dei CTL sono la pp65 e gli antigeni codificati dal gene IE1. Un vaccino ricombinante canaripox-pp65 è stato quindi messo a punto e testato, mostrando di stimolare una risposta anticorpale e cellulare di lunga durata (76).

Dal punto di vista della Sanità Pubblica, l'obiettivo principale della vaccinazione contro CMV è la prevenzione dell'infezione in gravidanza: l'immunità da essa conferita, infatti, potrebbe diminuire la probabilità di sviluppo di anomalie nel neonato, anche se non ridurrebbe il rischio di trasmissione dell'infezione dalla madre del feto.

Questo scopo implicherà la necessità di vaccinare tutte le donne in età fertile. Un punto critico, da cui dipenderanno le strategie vaccinali da adottare, è costituito dalla durata della protezione indotta dal vaccino. Se l'immunità sarà di breve durata, la vaccinazione potrebbe essere raccomandata prima di iniziare una gravidanza; se l'immunità sarà di media durata (5 anni), occorrerebbe somministrare dosi di vaccino successive alle donne in

età fertile; infine se l'immunità sarà di lunga durata, potrebbe essere presa in considerazione la vaccinazione in età infantile.

Il dosaggio del titolo anticorpale potrebbe essere utile per discriminare i soggetti che necessitano maggiormente del vaccino.

2.12 Metodi diagnostici

Esistono diverse metodiche per l'accertamento dell'infezione da CMV e le principali sono:

2.12.a Prove di isolamento

Costituiscono il metodo diagnostico classico e consistono nella semina del campione (urine, leucociti polimorfo nucleati, liquido di lavaggio bronco alveolare, saliva, ecc) in colture di fibroblasti polmonari di embrione umano, nei quali, se nel campione inoculato è presente il CMV, si sviluppa lentamente un caratteristico effetto citopatico con lesioni focali costituite da cellule vescicolose, rifrangenti e di dimensioni maggiori.

Tale sistema di indagine è molto sensibile ma ha lo svantaggio di essere molto lento, in quanto il tipico effetto citopatico compare spesso dopo la seconda o la terza settimana dall'inoculazione.

Un importante passo avanti nelle metodiche di isolamento di CMV è stato ottenuto con l'impiego delle "shell vials" e di un anticorpo monoclonale specifico per il prodotto del gene maggiore immediato precoce, IE1, di CMV (p72). Sfruttando una reazione di immunofluorescenza immunoperoxidasi, si può ottenere l'evidenziazione di CMV entro 16-24h dall'inoculo su colture di fibroblasti umani.

2.12.b Ricerca delle proteine virali

E' un approccio eseguito direttamente sul campione. Esso permette di identificare l'antigene strutturale precoce (pp65) del CMV nei leucociti polimorfo nucleati (PMNL), e in misura minore anche nei monociti-macrofagi e nei linfociti T, mediante una tecnica di immunofluorescenza indiretta (IFA) o di immunoperossidasi (IPA). La conferma dell'infezione virale è data dall'evidenziazione di una fluorescenza granulare a livello dei nuclei plurilobati (77).

Questo tipo di indagine risulta essere molto rapido e specifico; è un test particolarmente utile per il monitoraggio dell'infezione e del trattamento antivirale nei pazienti immunocompromessi.

2.12.c Ricerca degli acidi nucleici virali

E' anch'esso, come il precedente un metodo diagnostico rapido eseguito direttamente sul campione. Consiste nell'evidenziazione mediante sonde marcate specifiche per il DNA e per l'mRNA del CMV degli acidi nucleici virali. Le metodiche impiegate a questo scopo sono l'ibridizzazione in situ, il "dot blot" (78) e la PCR (Polymease Chain Reaction). Quest'ultima è una tecnica ad elevata sensibilità che viene applicata utilizzando soprattutto l'amplificazione di sequenze nucleotidiche del gene maggiore IE1.

2.12.d Ricerca delle particelle virali

Consiste in un esame diretto del campione mediante osservazione al microscopio elettronico; è un metodo di indagine poco sensibile e costoso.

2.12.e Sierologia

E' mirata all'individuazione di anticorpi specifici che però nella maggioranza dei casi, sono solo sinonimo di immunità e quindi di infezione pregressa. In effetti per la diagnosi di un'infezione in corso o recente è necessario valutare il titolo anticorpale anti-CMV nel siero, sia nella fase acuta che nella fase convalescente, con la dimostrazione della sierconversione o di un incremento significativo del titolo.

Talora, per motivi strettamente pratici, si ricorre all'esame di un solo campione di sangue in cui si ricercano le IgM specifiche, come segno di infezione in corso. Anche in questo caso però, bisogna sottolineare come spesso nelle donne gravide non compaiono o compaiono a titolo molto basso nelle infezioni acute secondarie, mentre titoli elevati sono stati ritrovati anche dopo molti mesi dall'esaurimento della fase acuta dell'infezione primaria (79).

Negli altri casi la presenza di IgM rivela uno stato di infezione acuta in corso o pregressa da poco tempo ma non permette di distinguere tra infezione acuta primaria e secondaria.

2.12.f DBS-test

Il Dried Blood Spot o DBS è un cartoncino di carta assorbente su cui vengono poste alcune gocce di sangue. Il DBS viene routinariamente raccolto da tutti i nuovi nati nei primi giorni di vita per eseguire gli screening per i test metabolici. Negli ultimi anni sempre più autori hanno individuato nel DBS il campione idoneo da applicare anche nello screening neonatale per la ricerca del CMV-DNA al fine di diagnosticare l'infezione congenita da CMV(80). Infatti il DBS è un campione con numerosi vantaggi: viene raccolto sistematicamente da tutti i neonati e viene conservato per almeno un anno in appositi centri di screening, non richiede alcun tipo di procedura per lo stoccaggio, può essere

spedito anche a laboratori lontani, non prevede procedure che richiedono la presenza di personale e laboratori specializzati. Inoltre è utilizzabile per la diagnosi retrospettiva: diagnosticare un'infezione congenita da CMV è impossibile se il bambino supera le due settimane di vita, ma la ricerca del CMV-DNA sul DBS raccolto alla nascita permette comunque l'esecuzione del test.

Esistono diverse tecniche per la ricerca dell'acido nucleico di CMV: la metodica standard che prevede un'estrazione con shock termico e un'amplificazione mediante nested-PCR (3,4) è una delle metodiche ancora utilizzate, nonché tra le più sensibili. I cartoncini vengono preparati a partire da una goccia di sangue ottenuta da una puntura sul tallone del neonato (figura 2.6); da ogni cartoncino vengono ricavati 3 dischetti, del diametro di 3mm, che permettono di ripetere il saggio in triplicato. Il sangue viene fatto eluire dal dischetto in modo da creare una soluzione in cui è presente l'acido nucleico che verrà poi amplificato mediante nested PCR. I risultati ottenuti mediante elettroforesi su gel di agarosio vengono analizzati ed interpretati per mezzo di un algoritmo (figura 2.7); il test richiede circa tre giorni di lavoro.

Negli anni successivi molti autori si sono cimentati nella ricerca di una metodica più rapida ed automatizzabile per la diagnosi del cCMV su DBS. Principalmente le altre metodiche prevedono un'estrazione mediante kit commerciale ed un'amplificazione mediante Real time PCR (77).

L'utilizzo di queste metodiche permettono di velocizzare notevolmente la procedura (sono necessarie al massimo 5 ore) e renderla perciò più conforme alle richieste di un test di screening. Sono stati messi a punto dei test di controllo di qualità internazionali, che permettono il controllo in cieco dei risultati ottenuti dai diversi laboratori con le diverse metodiche. Da questi controlli di qualità è emerso che l'estrazione con kit commerciali ed

amplificazione con Real Time-PCR non permettono l'individuazione del DNA virale in cartoncini con cariche virali inferiori o uguali a 10^3 copie/ml (4).



Figura6: Preparazione DBS

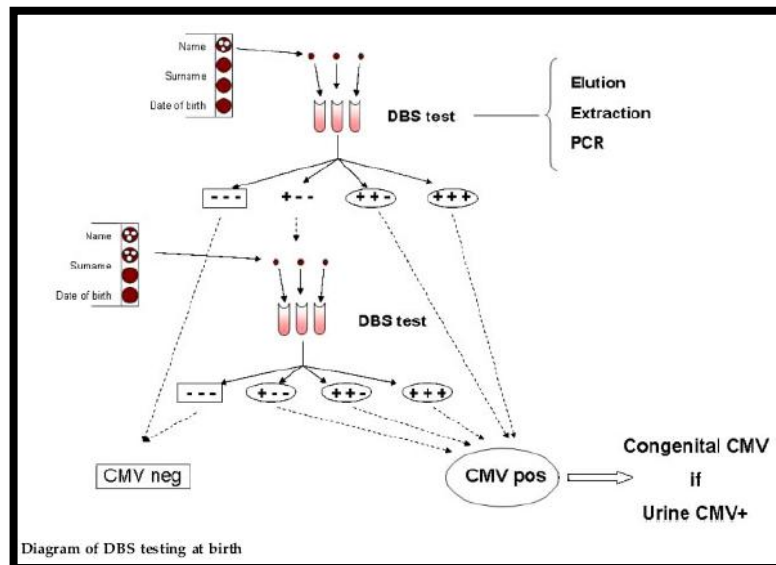


Figura 2.7: Algoritmo necessario all'interpretazione dei risultati da DBS

2.12.g DUS-test

Per ovviare al problema di sensibilità riscontrato nel DBS-test, molti autori (77) hanno cercato di mettere a punto una metodica simile, che utilizzasse comunque un campione secco, ma che partisse da materiale biologico con una carica virale maggiore. A tale scopo sono stati sperimentati i Dried Urine Spot o DUS, preparati a partire da urine raccolte entro le prime due settimane di vita lasciate essiccare su carta da filtro (foto...). Anche nel caso dei DUS sono state sperimentate sia procedure interamente in house, che prevedevano l'esatta sovrapposizione con la procedura e l'algoritmo utilizzati per i DBS, sia procedure che prevedessero l'estrazione con kit commerciali e Real Time-PCR.

La difficoltà di raccolta delle urine da neonati non ha permesso al DUS-test di svilupparsi notevolmente negli ultimi anni.



Figura 2.8: Raccolta urine nel neonato

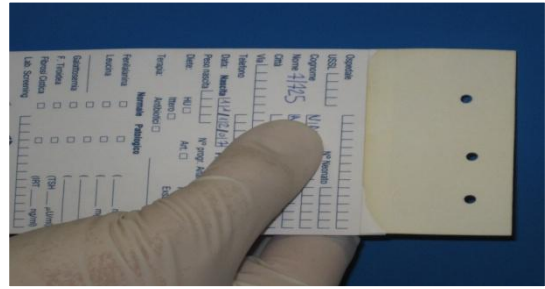


Figura 2.9: Preparazione DUS

2.12.h Real time PCR

La real-time PCR è una PCR quantitativa che utilizza un sistema computerizzato in grado di determinare la presenza di un virus specifico e la sua carica virale. Tale tecnica viene effettuata mediante un termociclatore con gruppo ottico capace di captare la fluorescenza, collegato ad un computer (figura 2.10). Questo sistema prevede dapprima la progettazione, attraverso un *foglio di lavoro*, della disposizione dei campioni sulla piastra. Generalmente sulle prime righe vengono inseriti i diversi campioni da testare, nella penultima riga viene inserito il controllo negativo, costituito dalla mix di reazione e da acqua bidistillata sterile e sull'ultima riga vengono inseriti i controlli positivi.



Figura 2.10: Termociclatore per la Real Time PCR

La tecnica della Real time PCR utilizza sonde sequenze-specifiche marcate con fluorofori il cui segnale fluorescente è emesso solo se nella reazione è presente il bersaglio specifico. Ciò che viene utilizzato è quindi una sonda oligonucleotidica, nota anche come TaqMan Probe.

Essa è presente nella mix per l'amplificazione, in quanto capace di individuare la sequenza target che ricerchiamo, compresa tra i primer, senso e antisenso, ma è bloccata all'estremità 3' per evitare l'estensione da parte della DNA polimerasi, ed è marcata con un fluoroforo chiamato reporter (R) ed un quencher (Q) ravvicinati. La vicinanza del reporter con il quencher permette, quando la sonda non ha ancora ibridizzato, una soppressione della fluorescenza. Invece se la sonda si lega con il DNA stampo, la DNA polimerasi inizia il procedimento di polimerizzazione, fino a quando incontra il blocco all'estremità 3' e lo "taglia" separando il reporter dal quencher, permettendo così l'emissione della fluorescenza da parte del reporter ora "libero". Ovviamente il segnale fluorescente, letto dal gruppo ottico dà informazioni qualitative sulla presenza del DNA virale, mentre il "numero" di reporter che da fluorescenza indicherà la quantità di DNA presente, consentendoci, una volta elaborato il dato, di calcolare la carica virale (figura 2.11).

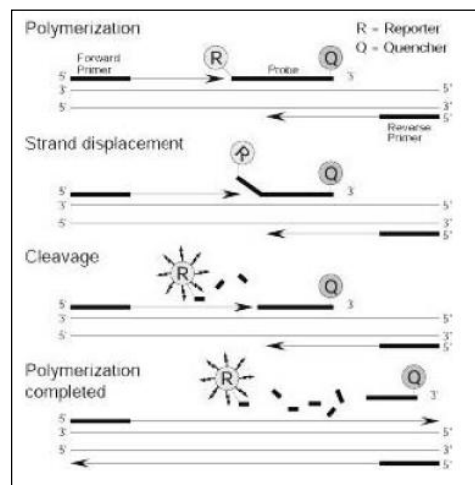


Figura 2.11: Schema del funzionamento della polarimerizzazione nella real time PCR

La Real time PCR registra i valori dell'intensità di fluorescenza durante ogni ciclo. Tali valori verranno messi in relazione al numero di cicli dando origine ad una curva di crescita. Durante i cicli iniziali della PCR (dal 6° ciclo al 15°), l'intensità della fluorescenza definisce la linea di base (o valore di fondo) del diagramma di amplificazione. Un aumento della fluorescenza al di sopra della linea di base indica la rivelazione del prodotto di PCR accumulato. Il *ciclo soglia* C_t è invece il numero di ciclo frazionario in cui l'intensità di fluorescenza ha un incremento statisticamente significativo e quindi supera la linea soglia impostata manualmente, detta Threshold (figura 2.12).

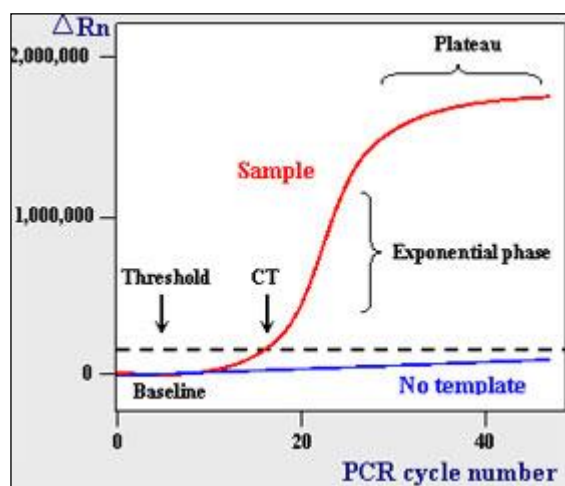


Figura 2.12: Curva esponenziale della Real time PCR

Il ciclo soglia si trova all'inizio, nel grafico di elaborazione finale (figura 8) della fase logaritmica lineare della curva di crescita. Maggiore è la quantità di bersaglio presente all'inizio, minori saranno i numeri di cicli necessari a raggiungere il C_t .

3.MATERIALI E METODI

Al fine di raggiungere l'obiettivo prefissato dalla tesi in questo lavoro si è scelto di utilizzare per la raccolta del campione di saliva dei nuovi tamponi salivari in nylon (FLOQ Swabs, Copan) che, secondo le indicazioni del produttore, hanno la caratteristica di rilasciare l'intero volume di campione assorbito, solo grazie all'agitazione su vortex.

Ogni fase dello studio è stata suddivisa in due punti: la validazione dove tutti i test sono stati eseguiti su campioni artificiali appositamente messi a punto e la popolazione in studio.

3.1 Fase I- *validazione*

In questa prima fase i tamponi salivari secchi sono stati estratti con un kit commerciale e il DNA virale è stato amplificato mediante nested-PCR (n-PCR). Al fine di poter confrontare le metodiche tradizionali con quelle di biologia molecolare ed interpretare correttamente i risultati, i campioni artificiali della validazione e quelli raccolti dalla popolazione in studio sono stati trattati secondo le metodiche comunemente utilizzate per la diagnosi di infezione da CMV. Sono perciò stati testati anche i corrispondenti tamponi salivari classici mediante isolamento virale rapido (IR-p72) e nested-PCR.

3.1.1 Estrazione DSS con kit commerciale

Sono stati allestiti controlli positivi e negativi di tamponi salivari secchi (dried saliva swab o DSS) artificiali al fine di validare il DSS-test. I controlli negativi sono stati preparati immergendo un tampone sterile in una provetta contenente E-MEM (Eagle Minimum Essential Medium con L-Glutammina, BioWhittake-Cambrex). I controlli positivi sono stati preparati immergendo un tampone sterile all'interno di soluzioni seriali in base 10

(range 1:10-1¹:10⁻⁷) a partire da una sospensione del ceppo di riferimento Towne di Cytomegalovirus (0.9ml) a titolo noto (4.323.250 copie/ml).

I DSS artificiali o mock-DSS preparati durante la fase di allestimento dei controlli positivi e negativi sono stati tagliati e inseriti all'interno di provette da 2 ml dopo almeno 24 ore, a temperatura ambiente. Tale accorgimento è stato apportato al fine di simulare il più possibile ciò che avverrebbe con un campione clinico.

Il kit commerciale QIAamp DNA Mini KitQiagen (DNA Purification from Buccal Swabs, spin protocol) prevede l'estrazione da tamponi salivari. I DSS sono stati tagliati con forbici sterilizzate mediante flambatura in provette da 2ml al cui interno sono stati aggiunti 400µl di PBS, 20µl di proteinasi K e 600µl del buffer in dotazione AL. Il campione così reidratato viene agitato su vortex e incubato per 10 minuti a 56°C. Questa temperatura permette l'attivazione della proteinasi K e il rilascio da parte del tampone della saliva raccolta.

Successivamente si aggiunge etanolo e si agita e si centrifuga per qualche secondo il campione che viene quindi trasferito in una provetta in dotazione nel kit da 1.5ml. Esse contengono un filtro in silicio posto a circa metà della provetta che permette dopo ripetuti lavaggi con i buffer AW1 e AW2 in dotazione e diverse centrifugazioni, di intrappolare il DNA virale nel filtro e di rilasciarlo nell'ultimo passaggio. Vengono quindi aggiunti 100µl di acqua distillata o di tampone AE in dotazione nel kit; il contatto dell'acqua con il filtro e l'incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti fa sì che il DNA intrappolato venga liberato sul fondo della provetta dopo una centrifuga a 8000 rpm per 1 minuto. Il prodotto viene poi utilizzato come template per la nested PCR.

3.1.1.a Amplificazione mediante nested-PCR

La ricerca del DNA virale è stata eseguita tramite amplificazione di una regione del genoma altamente conservata di CMV localizzata nel gene codificante per la glicoproteina dell'envelope gB; la metodica prevede una doppia amplificazione (step I e step II), che coinvolge sequenzialmente due regioni di DNA, una interna all'altra, e richiede quindi l'uso di due coppie di primer (71) per ogni sequenza riprodotta, in grado di amplificare una regione di 150kb ed una interna a questa di 100 kb (tabella 3.1).

Il I step prevede la preparazione di una miscela di reazione secondo le indicazioni riportate nella tabella 3.2; 45µl di questa miscela sono stati aliquotati in provette da 0.2ml, al di sopra delle quali è stata aggiunta una goccia d'olio di paraffina per ridurre il rischio di eventuali contaminazioni. In ciascuna provetta sono stati poi inoculati 5µl di DNA estratto ed è stata eseguita la prima amplificazione di 35 cicli (tabella 3.3), ai quali è seguita un'estensione a 72°C per 5 minuti.

Anche per il II step è stata preparata una miscela di reazione come riportato nella tabella 3.2 di cui 48µl sono stati posti in una provetta da 0,2ml cui è stata aggiunta una goccia di olio di paraffina. Sono dunque stati aggiunti 2µl del prodotto della prima amplificazione. La seconda amplificazione prevede 30 cicli ad una temperatura di annealing di 50°C, come mostrato nella tabella 3.4, ai quali fa seguito l'estensione finale a 72°C per 5 minuti.

PRIMERS ESTERNI:	
gB1 (F)	5' GAG GAC AAC GAA ATC CTG TTG GGC A 3' (nt 1942-1966)
gB2 (R)	5' GTC GAC GGT GGA GAT ACT GCT GAG G 3' (nt 2091-2067)
PRIMERS INTERNI:	
gB3 (F)	5' ACC ACC GCA CGT AGG AAT GTC AG 3' (nt 1967-1989)
gB4 (R)	5' TCA ATC ATG CGT TTG AAG AGG TA 3' (nt 2066-2044)

Tabella 3.1: Primer utilizzati nel I step (esterni) e nel II step (interni).

Reagenti	Concentrazione richiesta	Quantità di reagente per provetta (volume finale mix di reazione: 50µl)
Acqua distillata sterile Dnasi RNasi-free		29.1µl per il I step
		32.1µl per il II step
10 x PCR, buffer	1 x PCR, Buffer	5µl
Primers (10pm/µl=10µM)	1µM	5µl
DNTPs (25mM x nucleotide)	200µM	0.4µl
TaqPolimerase (2U/µl)	1U	0.5µl
Estratto/prodotto della I amplificazione		5µl per il I step
		2µl per il II step

Tabella 3.2: Lista reagenti e quantità necessarie alla preparazione della miscela di reazione per la PCR

La reazione di amplificazione è stata eseguita in un Thermal Cycler Gene Amp PCR System 9700 (AppliedBiosystems) alle condizioni riportate nelle tabelle 3.3 e 3.4.

N° cicli	Denaturazione	Annealing	Estensione
1	94°C x 2 min		
35	94°C x 30 sec	58°C x 30 sec	72°C x 3 sec
1			72°C x 5 min

Tabella 3.3: Condizioni di amplificazione per il Istep

N° cicli	Denaturazione	Annealing	Estensione
1	94°C x 2 min		
30	94°C x 30 sec	50°C x 30 sec	72°C x 3 sec
1			72°C x 5 min

Tabella 3.4: Condizioni di amplificazione del IIstep

3.1.1.b Visualizzazione dei prodotti di amplificazione

La visualizzazione dell'amplificato è stata realizzata mediante elettroforesi in gel di agarosio al 2% (agar Nusieve FMC, Bioproducts) contenente lo 0.5% di Syber green (SybrSafe DNA gel stain, Invitrogen). In ciascun pozzetto del gel sono stati seminati 10µl del prodotto della seconda amplificazione e 3µl di blu di bromofenolo: parallelamente agli amplificati è stato seminato un marcatore di pesi molecolari (50bp DNA ladder, Norgen).

E' stata quindi indotta una corsa elettroforetica con d.d.p. di 150V per 30 minuti. Le bande sono state evidenziate mediante transilluminazione con raggi UV e fotografate (figura 3.1)

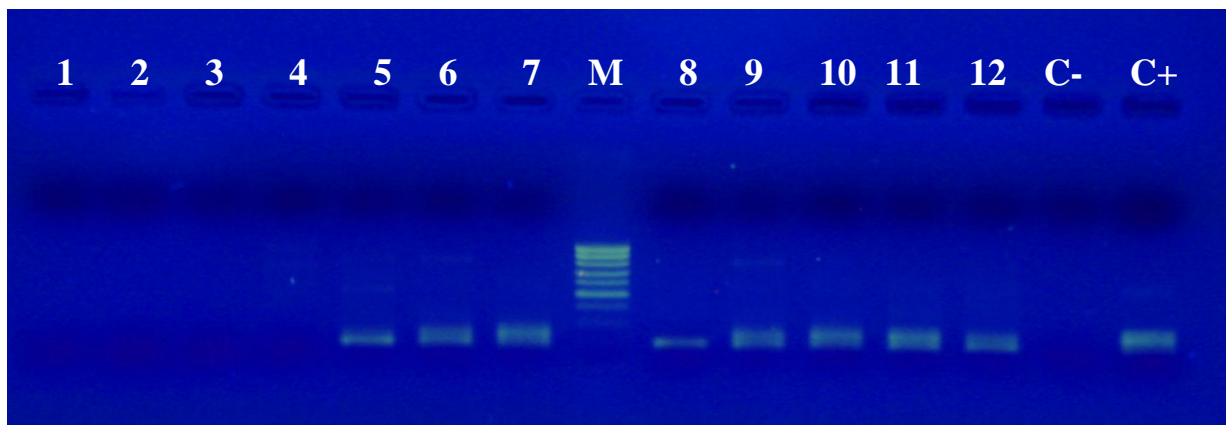


Fig 3.1: Risultati corsa elettroforetica su gel di agarosio. Le bande visibili a 100 bp rappresentano i risultati positivi; sono stati seminati 12 campioni; nel pozzetto segnato con M è stato inserito un marker per pesi molecolari; nel tredicesimo e quattordicesimo pozzetto sono stati inseriti rispettivamente il controllo negativo (C-) e il controllo positivo (C+)

3.1.2 Estrazione da CSS con shock termico

Sono stati allestiti tamponi salivari artificiali classici o mock-CSS (Classical Saliva Swab) immergendo dei tamponi salivari sterili nelle medesime soluzioni virale preparate per l'allestimento dei mock-DSS. Ogni mock-CSS è stato immerso in 800 µl di terreno di trasporto virale o VTM, al fine di conservare il campione anche per l'isolamento virale. Dopo aver agitato il tampone, un'aliquota da 50µl è stata posta in una provetta da 0,5ml per l'estrazione dell'acido nucleico mediante shock termico o st. Tale metodica permette di estrarre il DNA dalle cellule utilizzando un repentino sbalzo di temperatura: il campione viene posto in un termociclatore (Perkin Elmer USA) prima a 72°C per circa 45 secondi, poi bruscamente raffreddato a 4°C. Il campione è stato quindi conservato a -80°C per una notte. Il giorno seguente l'estratto può essere utilizzato come templatò nella nested-PCR, descritta nel paragrafo 3.1.1.a, i cui risultati sono visibili per mezzo di una corsa elettroforetica su gel di agarosio. L'interpretazione dei risultati ottenuti è spiegata nel paragrafo 3.1.1.b

3.1.3 Metodologia di riferimento: isolamento virale rapido (IR-p72)

L'isolamento virale in coltura cellulare è il metodo diagnostico classico e ritenuto gold standard per la ricerca del Cytomegalovirus. Questa metodica permette di osservare su monostrati di fibroblasti polmonari di embrione umano, l'effetto citopatico del virus. Si tratta di un metodo sensibile seppur lento: il caratteristico effetto citopatico (CPE) compare spesso dopo la seconda settimana dall'inoculo a causa della bassa velocità di replicazione del CMV.

Per ottenere i risultati più velocemente si utilizza un isolamento virale rapido che permette la diagnosi mediante la ricerca della proteina precocissima p-72 che compare già dopo 1 ora (IR-p72). Anche la metodologia veloce è ritenuta valida e di riferimento per la diagnosi di infezione congenita da CMV in campioni di urina e saliva raccolti entro le prime due settimane di vita.

3.1.3.a Allestimento Shell Vials (SV)

Per l'isolamento virale di CMV vengono utilizzate le Shell Vials o SV, preferite alle tradizionali fiasche o tubi di coltura; esse sono provette da 7 ml a fondo piatto contenenti un vetrino rotondo del diametro di 1 cm (ditta Flow). L'isolamento virale rapido si esegue su cellule polmonari di visone in linea continua (MinkLung,ML), coltivate in fiasche da 75cc (ditta Iwaki); da ogni fiasca vengono allestite 60 SV. Per staccare le cellule dalla fiasca e trasferirle nelle SV è stato utilizzato un metodo chimico: è stato dunque osservato lo stato del monostrato cellulare al microscopio, eliminato il terreno contenuto nella fiasca e infine aggiunti 4cc di Tripsina-EDTA o TV (ditta Lonza). La fiasca è stata quindi lavata due volte, aggiungendo ed eliminando 4cc di Tripsina; infine sono stati aggiunti ancora 1,5ml di TV, si è lasciato agire e, dopo aver staccato le cellule dal supporto, la Tripsina è

stata eliminata e tamponata con 4cc di terreno. La sospensione ottenuta viene a sua volta dispersa in 27 cc di E-MEM al 2% (Eagle Minimum Essential Medium con L-Glutamina, BioWhittake-Cambrex) addizionato con 3 cc di siero fetale bovino (SF, Lonza); successivamente si pongono 1,5 cc di tale sospensione in ogni SV contenente circa 600.000 cellule.

3.1.3.b Applicazione dell'IR-p72 su campioni di saliva liquida

Da ogni mock-CSS è stata prelevata un'aliquota da 200 µl che è stata seminata all'interno di una shell vials (SV) preparata secondo la procedura riportata nel paragrafo precedente. In particolare ogni SV è stata svuotata del terreno di mantenimento E-MEM ed inoculata con 200µl di saliva, per consentire all'eventuale virus presente nel campione l'ingresso nelle cellule di ML. Al termine di questo passaggio le cellule, se il campione è positivo, sono state infettate. Per evitare inquinamenti o aspecificità il campione viene eliminato e alle SV vengono aggiunti 1.5 ml di terreno E-MEM addizionato con SF al 2% e poste overnight in un incubatore a CO₂ a 37°C.

Dopo tale intervallo si è proceduto alla fissazione e colorazione del vetrino mediante la metodica per l'immunofluorescenza indiretta (IFA) che permette l'individuazione della proteina precocissima dell'envelope di CMV p-72.

È stato dunque aspirato il terreno da ogni SV con una pipetta Pasteur e sono stati eseguiti due lavaggi con PBS CaMg; una volta lavato il campione è stato fissato al vetrino con una miscela composta da 1/3 di metanolo e 2/3 di acetone, conservata a -20°C. Al termine di un'incubazione di 10 minuti si è proceduto al prelievo del vetrino dalla SV con una pinzetta adatta a punte ricurve; il vetrino è stato quindi posto in una piccola Petri in cui è stato lavato 2 volte con PBS CaMg. I residui dell'ultimo lavaggio vengono interamente eliminati

mediante aspirazione con una Pasteur e quindi si aggiungono 25µl di monoclinale (Anti HCMV I.E.A. 11-003, ditta Argene) anti-CMV. Il vetrino è stato incubato per 30 minuti a 37°C in camera umida. Al termine del periodo si è proceduto a un doppio lavaggio del vetrino con PBS CaMg. Dopo aver eliminato i residui dell'ultimo lavaggio sono stati aggiunti 35µl di coniugato fluoresceinato (Anti mouse IgG+IgM FICT Conjugated). Il vetrino è stato quindi nuovamente incubato a 37°C per 30 minuti in camera umida. Al termine di questa fase d'incubazione sono stati effettuati altri 2 lavaggi con PBS CaMg seguiti da un terzo con acqua distillata; con una pinzetta è stata tolta dalla Petri il vetrino e, dopo aver eliminato l'eccesso di liquido, e si è adagiato il vetrino della SV su un vetrino portaoggetti sul quale era già stata posta una goccia di glicerolo tamponato. Il vetrino è stato quindi letto al microscopio a fluorescenza a luce incidente (ditta Leitz; mod.Lsborlux 11) con lampada a vapori di mercurio di 50 watt ed ingrandimenti x10, x25, x40. La caratteristica fluorescenza nucleare granulare, (verde mela brillante), è indice di positività (figura 3.2).

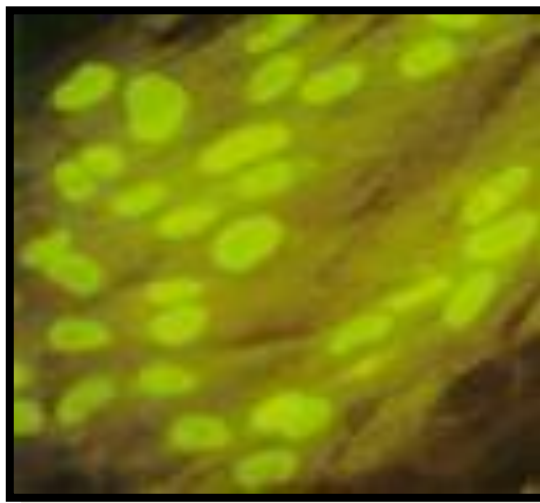


Fig.3.2: Visualizzazione di positività per CMV mediante immunofluorescenza indiretta

3.1.4 Popolazione in studio nella Fase I

Sono stati raccolti 451 tamponi salivari secchi e i corrispondenti tamponi salivari tradizionali o CSS da bambini di età compresa tra 1 giorno e 6 anni di vita. 41 tamponi sono stati scartanti in quanto non è stato possibile raccogliere in parallelo il campione liquido o perché i genitori non hanno aderito allo studio firmando l'apposito modulo di richiesta (vedere allegato 1).

I restanti 410 campioni clinici sono stati suddivisi in tre gruppi distinti in base al reparto di appartenenza o alla storia clinica:

GRUPPO A: sono stati raccolti 45 DSS e 45 CSS da 21 bambini con infezione congenita o perinatale accertata da CMV. A questo gruppo appartengono bambini inseriti nel follow-up; essi costituivano il gruppo di controllo positivo.

GRUPPO B: sono stati raccolti 313 DSS e 313 CSS da bambini nati presso l'Ospedale Mangiagalli nel periodo compreso tra giugno e luglio del 2008. Tali bambini sono nati o erano ricoverati presso l'Ospedale e hanno tutti un'età inferiore a 14 giorni di vita.

GRUPPO C: sono stati raccolti 52 DSS e 52 CSS da bambini ricoverati presso l'Ospedale Mangiagalli nel periodo compreso tra giugno e luglio del 2008, con età compresa tra 15 e 45 giorni di vita.

3.1.4.a Raccolta e trattamento dei campioni DSS e CSS clinici

I DSS e CSS sono stati raccolti contemporaneamente dallo stesso bambino. È stato richiesto espressamente che venissero raccolti almeno due ore dopo la poppata e prima della successiva, in modo da evitare contaminazioni da latte.

Sia i DSS che i CSS sono stati raccolti inserendo i tamponi all'interno della bocca del bambino, strofinando sulla parete interna della guancia, assicurandosi che venissero

imbevuti dalla saliva. I DSS sono stati poi riposti nel proprio astuccio sterile tal quali e lasciati a temperatura ambiente, mentre i CSS sono stati immersi in 0,8ml di VTM (Viral Transport Medium) e conservati a 4°C. Va specificato che generalmente i CSS sono costituiti da tamponi di cotone e il VTM viene preparato all'interno di provette sterili nel nostro laboratorio.

I DSS e i CSS sono stati così preparati (figura 3.3):

-DSS: ogni tampone è stato tagliato all'interno di una provetta da 2ml con un paio di forbici sterilizzate mediante flambatura ed estratto secondo il protocollo per tamponi salivari Qiagen (paragrafo 3.1.1)

-CSS: ogni tampone immerso nel VTM è stato agitato mediante vortex. Un'aliquota di 200 µl è stata utilizzata per l'isolamento virale rapido in coltura cellulare (conservati a 4°C), mentre un'aliquota da 50 µl è stata sottoposta a shock termico, secondo il metodo routinariamente adottato nel nostro laboratorio e consultabile al paragrafo 3.1.2.

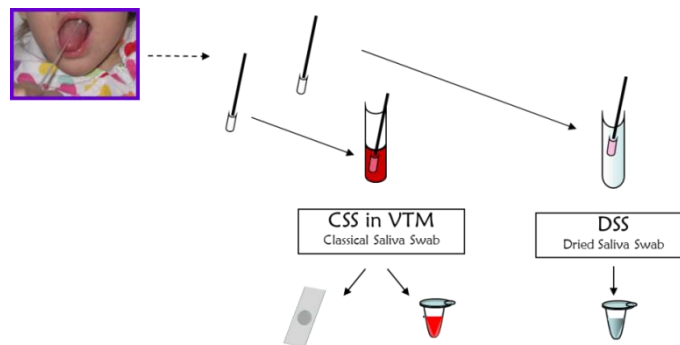


Fig. 3.3: Preparazione DSS e CSS clinici

3.2 Fase II: *validazione*

In questa fase si è cercato di ridurre i costi che l'uso di un kit di estrazione commerciale comporta. Prendendo spunto dalla pratica quotidiana in uso nel nostro laboratorio e dal trattamento utilizzato per altri campioni secchi come il sangue e l'urina, si è cercato un metodo di estrazione alternativo. Si è dunque reidratato il campione secco con il terreno di coltura E-MEM (vedere paragrafo 2.12.f, DBS-test). Dopo una prima fase di validazione su campioni artificiali, la metodica è stata testata su bambini frequentanti l'asilo nido o la scuola materna, dove la prevalenza d'infezione, seppure asintomatica, è notoriamente elevata.

3.2.1 *Estrazione dei DSS senza kit commerciale*

Sono stati preparati dei campioni artificiali (mock-DSS) al fine di simulare la preparazione dei DSS clinici.

In particolare sono state allestite delle diluizioni seriali del virus in base 10 (range 1:10-1¹:10⁻⁷) di una sospensione virale di CMV (ceppo di riferimento Towne) a titolo noto (4.323.250 copie/ml). In ogni diluizione è stato immerso un tampone di nylon; i mock-DSS così imbevuti sono stati conservati nel loro contenitore sterile per almeno 24 ore a temperatura ambiente al fine di simulare il trattamento di un eventuale campione clinico. Al termine dell'incubazione ai tamponi sono stati aggiunti 100µl di E-MEM e sono stati agitati mediante vortex per almeno 15 secondi. Un'aliquota di 50µl è stata poi sottoposta a shock termico secondo le modalità descritte nel paragrafo 3.1.2 (figura 3.4). Il CMV-DNA è stato amplificato, per entrambe le aliquote, mediante n-PCR secondo la metodica descritta nel paragrafo 3.1.1.a.

Come controllo negativo è stato sottoposto alla stessa procedura anche un tampone sterile. I prodotti dell'amplificazione sono stati visualizzati su un gel di agarosio al 2% come descritto nel paragrafo 3.1.1.b.

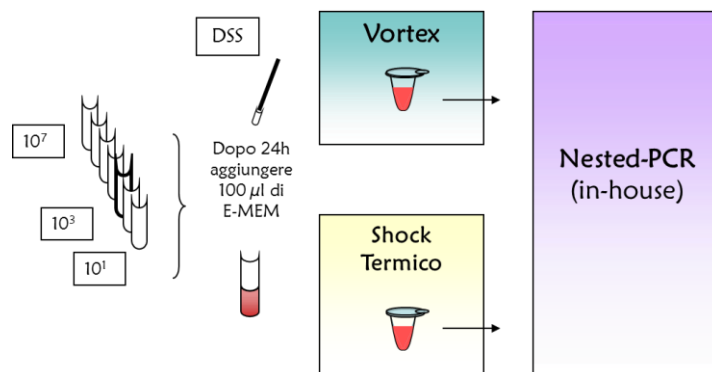


Fig. 3.4: Validazione DSS-test senza kit commerciale

3.2.2 Popolazione in studio nella Fase II

Al fine di testare la nuova metodica di estrazione da DSS su una popolazione con un'elevata prevalenza di CMV abbiamo reclutato nello studio un asilo nido e una scuola materna della provincia di Milano. È stato distribuito un volantino informativo e un modulo per il consenso informato (Allegato2 e 3) per permettere ai genitori di aderire allo studio e conoscere le modalità di raccolta dei campioni e il trattamento dei dati. Sono stati dunque raccolti due tamponi per ognuno dei 142 bambini frequentanti l'asilo nido e la scuola materna: il primo è stato lasciato tal quale nel proprio astuccio sterile, mentre il secondo è stato immerso in VTM al fine di poter confrontare i risultati ottenuti sul DSS con il corrispondente CSS.

Parallelamente sono stati raccolti DSS e CSS anche da un gruppo di 17 bambini in follow-up e 17 neonati con sospetto di infezione. La casistica della fase II è dunque stata suddivisa in tre gruppi, che per comodità chiameremo D, E e F, per distinguerli dai gruppi della fase I:

GRUPPO D: sono stati raccolti 34 DSS da 17 bambini con infezione congenita o post natale accertata di età compresa tra 30 giorni e 2 anni.

GRUPPO E: sono stati raccolti 142 DSS da altrettanti bambini così suddivisi: 92 bambini frequentanti la scuola materna (età 3-6 anni) e 49 bambini frequentanti l'asilo nido (età 1-3 anni).

GRUPPO F: sono stati raccolti 17 DSS da altrettanti bambini con sospetto d'infezione da CMV, di età compresa tra 1 giorno e 5 mesi.

I 34 DSS raccolti dal gruppo D, composto da 17 bambini con infezione da CMV accertata, corrispondono a invii successivi degli stessi bambini. Quest'ultimi sono inseriti nel programma di follow-up: dal momento in cui viene accertata l'infezione congenita il bambino viene controllato a 1,3,6,9,12,18 e 24 mesi di vita. Dopo i due anni i bambini vengono controllati una volta l'anno fino ai sei anni di età. Ciò permette di individuare precocemente l'insorgenza di sequele. Ad ogni controllo sono dunque stati raccolti due tamponi per ciascun bambino, uno secco e uno liquido al fine confrontare i risultati ottenuti nei test con i due tipi di tampone.

Ai genitori dei bambini frequentanti l'asilo nido e la scuola materna (gruppo E) è stato richiesto di leggere il foglietto informativo che riportava i dati epidemiologici dell'infezione da CMV e le norme preventive per ridurre il rischio di infezione (allegato 2). Parallelamente è stato anche consegnato il modulo per il consenso informato al fine di prelevare il tampone ai soli bambini con i genitori favorevoli allo studio. Per garantire l'anonimato, i consensi sono stati consegnati alle maestre che si preoccupavano di chiamare il bambino e di assisterci durante il prelievo. Ad ogni coppia di tamponi veniva dunque assegnato un codice al quale venivano associati il sesso e l'età del bambino. Al

termine dello studio si è tenuta, nella sede della scuola materna, una riunione con i genitori al fine di presentare i risultati ottenuti in modo aggregato. Ciò ha permesso ai presenti di porre domande inerenti alle modalità di trasmissione e agli strumenti preventivi. È stato anche sottolineato che tali misure preventive erano di tipo universale e che seguirle avrebbe permesso ai genitori di prevenire l'insorgenza anche di altri agenti patogeni a trasmissione verticale o orizzontale dannosi per il feto.

Nella sede dell'asilo nido non è stato possibile organizzare una riunione esplicativa, per tanto i risultati aggregati e le raccomandazioni generali sul comportamento opportuno al fine di limitare la trasmissione del CMV e di altri patogeni sono stati distribuiti ai genitori per mezzo di una lettera (allegato 3)

I bambini del gruppo F hanno un'età compresa tra 1 giorno e 5 mesi di vita e sono giunti alla nostra attenzione o perché la mamma ha avuto una sieroconversione in gravidanza o in quanto al momento della nascita o durante i primi mesi d'età i bambini hanno presentato una sintomatologia associabile all'infezione congenita da CMV.

3.2.2.a Trattamento dei campioni DSS e CSS clinici

Come fatto per la validazione anche ai campioni clinici sono stati aggiunti 100µl di E-MEM e sono stati sottoposti ad agitazione mediante vortex per almeno 15 secondi. Metà campione è stato lasciato tal quale. L'agitazione del campione è una procedura che serve esclusivamente a permettere il rilascio della saliva dal tampone al terreno e non consente un'estrazione vera e propria dell'acido nucleico dalle cellule presenti. Per comodità abbiamo comunque indicato questa fase della preparazione del campione come una procedura di estrazione, facilitando la comprensione e il confronto tra le metodiche utilizzate.

L'aliquota rimanente è stata sottoposta a shock termico come indicato nel paragrafo 3.1.2.

Da tutti i gruppi sono stati raccolti anche i corrispondenti CSS. Questi sono stati immersi in 0.8ml di VTM, subito dopo il prelievo e un'aliquota da 50µl è stata sottoposta a st secondo la procedura riportata nel paragrafo 3.1.2.

Tutti i campioni sono stati quindi amplificati mediante nested-PCR, come indicato nel paragrafo 3.1.1.a e i prodotti di amplificazione sono stati evidenziati mediante una corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%, così come riportato nel paragrafo 3.1.1.b.

3.3 Fase III: *validazione*

In questa fase si è cercato di trovare un metodo che permettesse di abbreviare i tempi. In previsione di uno screening neonatale il tempo che deve intercorrere tra il prelievo del campione e l'esito dell'esame diagnostico deve risultare il minore possibile. A tal fine è stata testata una Real Time-PCR commerciale su DSS.

3.3.1 Verifica dell'utilizzo di una Real Time-PCR commerciale su DSS

Per validare una metodica che prevedesse l'utilizzo dei DSS e di una Real Time-PCR (RT-PCR) sono state allestite diluizioni seriali in base 10 (range 1:10-1⁻¹:10⁻⁷) a partire da una sospensione del ceppo di riferimento Towne di Cytomegalovirus (0.9ml) a titolo noto. Da prove preliminari era emerso che probabilmente il terreno di coltura E-MEM inibiva l'amplificazione mediante il kit CMV R-gene, (69-003 B, Quantification Kit, Argene) Real Time-PCR.

Sono stati quindi prelevati 80µl di ogni sospensione virale, pari al volume assorbito da un tampone di nylon e sono stati addizionati a 100µl di E-MEM e 100µl di acqua sterile per

biologia molecolare. Entrambe le aliquote sono state testate sia in n-PCR che in RT-PCR (figura 3.5). Inoltre al fine di chiarire il più possibile l'eventuale inibizione dovuta all'E-MEM si è scelto di estrarre 200µl di ognuna delle soluzioni seriali anche con un kit commerciale (protocollo "DNA purification from blood or body fluids", spin protocol, Qiagen). I prodotti di estrazione sono quindi stati risospesi in 100µl di terreno E-MEMe 100µl di acqua sterile per biologia molecolare ed amplificati sia in nested che in Real Time-PCR (figura 3.6).

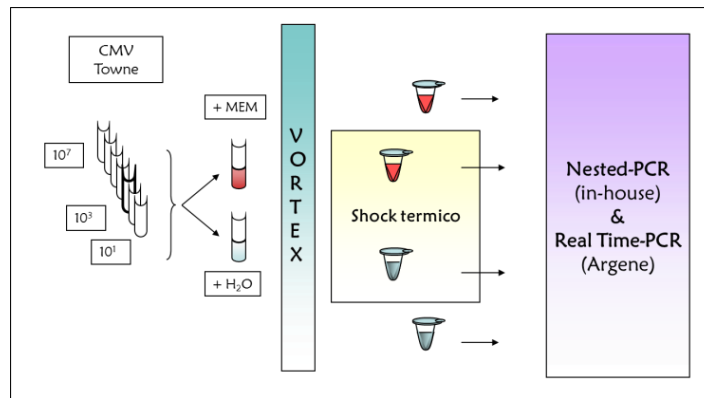


Fig. 3.5: Validazione Real Time-PCR commerciale per DSS. In questa prova vengono confrontati i risultati ottenuti reidratando il tampone salivare secco con E-MEM o con acqua

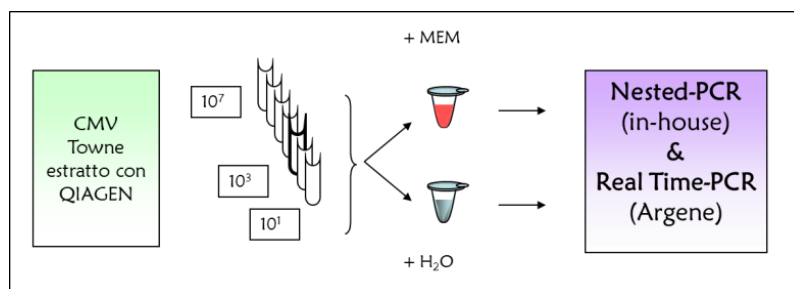


Fig. 3.6: Validazione Real Time-PCR commerciale per DSS. In questa prova le diluizioni del virus sono state estratte con kit commerciale e le aliquote diluite in E-MEM o acqua

Le sospensioni virali di partenza sono state sottoposte a tre diversi tipi di estrazione.

- *Estrazione mediante agitazione*: 80µl di ogni diluizione virale sono stati posti in 2 provette da 0,5ml a cui sono stati aggiunti rispettivamente 100µl di E-MEM e 100µl di acqua RNAasi e DNAasi-free.
- *Estrazione mediante shock termico*: Per ogni diluizione sono stati raccolti 80µl che sono stati posti in una provetta con 100µl di E-MEM. Lo stesso procedimento è stato eseguito anche aggiungendo 100µl di acqua RNAasi e DNAasi-free. Le aliquote sono quindi state sottoposte a shock termico come illustrato nel paragrafo 3.1.2.
- *Estrazione commerciale*: 200µl della sospensione virale intera e le sue diluizioni sono state estratte mediante kit commerciale QIAamp DNA Mini Kit Qiagen (protocollo “DNA purification from blood or body fluids”, spin protocol, Qiagen). Il protocollo prevede inizialmente la preparazione in una provetta da 2ml di 200µl di buffer AL e 20µl di proteinasi K in dotazione con il kit. Dopo aver aggiunto il campione da estrarre e 10µl di IC₂ (vedere paragrafo 3.3.c), la soluzione è stata riscaldata per 15 minuti a 56°C per 15 minuti. Al termine sono stati aggiunti 200µl di etanolo al 100%, la provetta è stata agitata, brevemente centrifugata e, infine, il suo contenuto inoculato in una provetta da 2ml, che presenta un filtro di silicio. Come riportato nel paragrafo 3.1.1 dopo una serie di lavaggi con buffer specifici e centrifugazioni, il DNA presente nel filtro è stato liberato aggiungendo 100µl di acqua distillata o buffer AE. Sono stati aliquotati 80µl di estratto in due provette, contenenti rispettivamente 100µl di E-MEM e 100µl di acqua per biologia molecolare.

Tutte le aliquote così preparate sono state amplificate sia mediante nested-PCR che Real Time-PCR.

3.3.b Amplificazione mediante nested-PCR

Circa 100kb del gene gB di CMV sono state amplificate mediante una PCR a due step (nested-PCR) in house. Le coppie dei primers usate, il protocollo e l'interpretazione dei risultati sono visibili ai paragrafi 3.1.1.a e 3.1.1.b.

3.3.c Amplificazione mediante Real Time-PCR (Argene)

Tutti i campioni, indipendentemente dal trattamento subito per l'estrazione del DNA, sono stati amplificati anche con la Real Time-PCR impiegando il termociclatore 7300 REAL TIME PCR System (Applied Biosystems) e il kit CMV-Rgene (Argene).

La procedura prevede una amplificazione specifica per la regione del gene IE (immediate early) di CMV e per una regione specifica del controllo interno presente nel kit (IC₂). Al fine di validare la seduta, in tutti i campioni da testare sono stati aggiunti 10µl del controllo interno (IC₂), costituito da una regione di DNA plasmidico, prima dell'estrazione; l'IC₂ è stato aggiunto anche al *bianco*, cioè ad una provetta contenete 100µl di acqua sterile per biologia molecolare, presente nel kit (AO), processata insieme e con lo stesso procedimento degli altri campioni clinici. Ciò permette di verificare non solo che l'estrazione sia avvenuta in assenza di contaminazione, ma anche se la reazione di amplificazione della RT-PCR sia avvenuta con successo. Nel kit è anche presente un controllo di sensibilità (CS), cioè un campione positivo a bassa carica virale, che permette di verificare l'effettiva performance della reazione.

La miscela di amplificazione (CMV R0) è già pronta all'interno del kit e contiene:

- sequenze specifiche per il gene IE di CMV
- sequenze specifiche per il controllo interno (IC₂)
- TAQ polimerasi

Per la Real Time-PCR sono state utilizzate delle piastre a 96 pozzetti; ognuno con un volume di 200µl.

Sul computer è presente il software dello strumento Real Time ABI 7300 che permette di estrapolare ed elaborare i dati letti dal gruppo ottico. Sul *foglio di lavoro* presente nel software che riproduce fedelmente la piastra si può indicare quali pozzetti della piastra sono utilizzati in quella seduta di Real Time, il target da ricercare e il nome assegnato al campione. La presenza del DNA plasmidico del controllo interno e dell'eventuale CMV-DNA è espressa dal rilascio dei fluorometri legati alle sonde (vedere paragrafo 2.12.h). Nel nostro caso la lettura del DNA di CMV avverrà per mezzo del fluorometro FAM (lunghezza d'onda di 530nm), mentre il controllo interno verrà letto dal VIC ad una lunghezza d'onda di 560nm.

Insieme ai campioni in questa fase di validazione sono stati inseriti anche degli *standard* cioè soluzioni contenenti CMV-DNA a titolo noto e in quantità esponenziali. In particolare QS₁ contiene 10⁶ copie/ml di CMV-DNA, QS₂ 10⁵ copie/ml, QS₃ 10⁴ copie/ml e QS₄ contiene 10³ copie/ml.

Tali controlli positivi vengono utilizzati per eseguire una RT-PCR di tipo quantitativo. Nel nostro caso è stato inserito solo il controllo QS₃, necessario per l'interpretazione dei risultati, in quanto in questa fase era sufficiente ottenere un risultato di tipo qualitativo. (vedere figura 3.7).

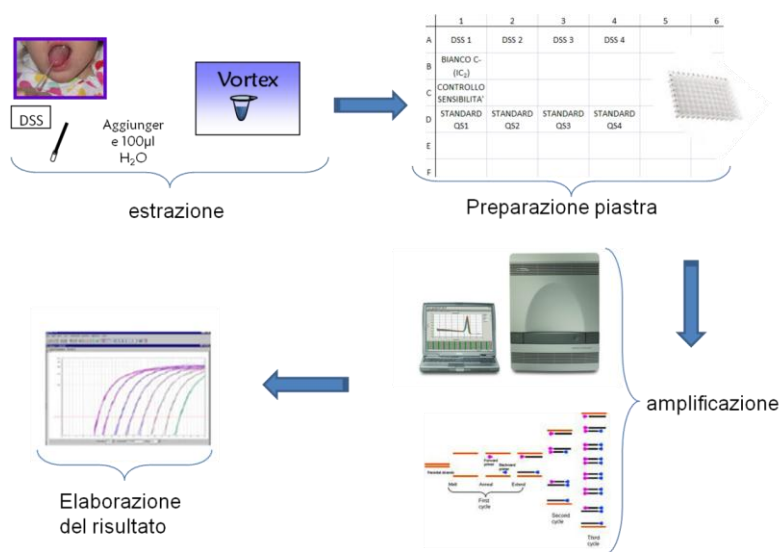


Fig. 3.7: Procedura di amplificazione mediante Real Time.

Nella sala mix è stata preparata la piastra in cui sono stati aliquotati 15µl della miscela MIX CMV R0 all'interno di ogni pozzetto, seguendo lo schema individuato precedentemente durante la preparazione del *foglio di lavoro*. Sono stati considerati anche i pozzetti che sarebbero stati usati per lo standard, il controllo di sensibilità CS e il controllo negativo. Nella stessa sede sono stati anche posti nel pozzetto del *bianco* 15µl della soluzione AWO, presente nel kit come controllo negativo, mentre tutti gli altri campioni sono stati inseriti nei rispettivi pozzetti nel laboratorio secondo l'ordine stabilito nel *foglio di lavoro*.

Una volta posta la piastra in macchina è stato applicato il protocollo di amplificazione previsto dal kit e riportato nella tabella 3.5

n°cicli	temperatura x tempo	steps
1	95°C x 15 minuti	attivazione TAQpolimerasi
45	95°C x 10secondi	denaturazione
	60°C x 40 secondi	annealing/ estensione

Tab. 3.5: condizioni nested PCR

3.3.d Interpretazione dei risultati

La Real Time, come la PCR tradizionale, prevede cicli di replicazione successivi che permettono di aumentare la quantità del DNA target qualora presente in modo esponenziale. Esiste una soglia oltre la quale il campione può essere considerato positivo: se un campione contiene il CMV-DNA la curva di fluorescenza corrispondente supererà questo limite e “crescerà” con un andamento esponenziale. Tanto prima e tanto più è basso il numero di cicli al quale il campione supera la soglia, tanto più contiene copie di CMV-DNA. Il ciclo in cui un campione supera la soglia è chiamato *ciclo soglia* o *ct*. Viceversa se il campione è negativo la curva della fluorescenza non supererà la soglia.

La lettura della fluorescenza non avviene durante tutto il corso della reazione, ma in un intervallo predefinito; ciò permette di limitare la visualizzazione del *rumore di fondo* prodotto da reazioni aspecifiche che possono avvenire durante i cicli di amplificazione; la fluorescenza emessa è comunque molto bassa e non supera la linea soglia, quindi non si ottengono falsi positivi.

Affinchè la seduta possa essere considerata valida sono presenti all'interno del kit dei parametri fissi che devono essere soddisfatti:

- il controllo negativo deve risultare negativo per CMV
- l'IC₂ del *bianco* deve risultare positivo e la curva di amplificazione non deve superare la soglia oltre il trentaduesimo ciclo
- lo standard QS₃ deve superare la soglia tra il trentesimo e il trentacinquesimo ciclo

A questo punto è necessario controllare se ogni singolo campione risulta inibito o meno. Per farlo bisogna confrontare il *ciclo soglia* dell'IC₂ di ogni campione con quello del bianco: se i valori non discostano di più di 3 cicli, si può considerare il campione non inibito. Se in un campione inibito è presente anche la curva di fluorescenza del CMV-DNA

esso può essere considerato qualitativamente positivo, ma, qualora venisse effettuata un'analisi quantitativa, il dato calcolato non può essere considerato corretto e l'analisi va ripetuta a partire dall'estrazione.

3.3.1 Popolazione in studio nella fase III

Sono stati raccolti 84 DSS e 74 CSS da 50 bambini, suddivisi in tre gruppi:

GRUPPO G: è costituito da 5 bambini con infezione da CMV post-natale accertata, di età compresa tra 24 e 30 mesi. Questo piccolo gruppo è stato utilizzato a supporto della validazione per chiarire il potenziale ruolo inibitorio dell'amplificazione mediante RT-PCR del terreno di coltura E-MEM.

Sono stati raccolti due DSS: uno è stato immerso in 100µl di E-MEM e l'altro in 100µl di H₂O sterile. Per una migliore facilità di lettura verranno chiamati rispettivamente DSS-M e DSS-H. Entrambi i DSS sono stati agitati e un'aliquota da 50µl è stata sottoposta a shock termico come indicato nel paragrafo 3.1.2. Tutte le aliquote sono state sottoposte sia a n-PCR che RT-PCR, come descritto rispettivamente nei paragrafi 3.1.1.a e 3.3.c (figura 3.8)

GRUPPO H: è costituito da 12 bambini arrivati all'attenzione del nostro laboratorio per un sospetto di infezione congenita. I neonati hanno un'età compresa tra 1 e 34 giorni di vita; da ciascuno di loro sono stati raccolti un tampone salivare secco e uno liquido, CSS (vedere figura 3.9).

GRUPPO I: è costituito da 33 bambini con infezione da CMV accertata alla nascita. Sono stati prelevati 62 DSS-H e 62 CSS, ad età diverse, come previsto dal programma di follow-up. L'età dei bambini era compresa tra 17 giorni e 3 anni (figura 3.9).

3.3.1.a Trattamento dei campioni

I tamponi raccolti nei gruppi G, H e I, indipendentemente se secchi o liquidi, immersi in terreno o acqua, sono stati sottoposti ad agitazione mediante vortex per almeno 15 secondi.

Dai tamponi secchi dei bambini del gruppo G sono stati aliquotati 50µl di soluzione sia dai CSS che dai DSS -H e DSS-M in provette da 0.2ml, queste sono state sottoposte a shock termico come indicato nel paragrafo 3.1.2.

I DSS degli altri gruppi sono stati reidratati esclusivamente in acqua e agitati mediante vortex.

Sia i CSS che i DSS sono stati testati mediante n-PCR, come descritto nel paragrafo 3.1.1.a; tutti i campioni secchi, sono stati sottoposti a RT-PCR commerciale (Argene), così come riportato nel paragrafo 3.3.c (vedere figure 3.8 e 3.9). l'interpretazione dei risultati è consultabile, per entrambe le metodiche ai paragrafi 3.1.1.b e 3.3.d.

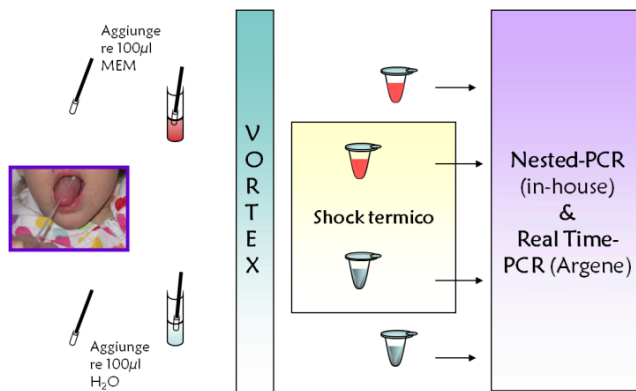


Fig. 3.8: Trattamento dei campioni del gruppo G

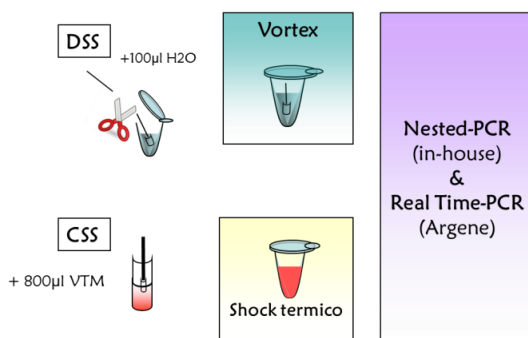


Fig. 3.9: Trattamento dei campioni dei gruppi H e I

3.4 Fase IV

In quest'ultima fase si è cercato di individuare un possibile fattore di prognosi negativa.

La metodica che vede utilizzare il DSS immerso in acqua, agitato e testato tal quale in Real Time-PCR è stato il punto di partenza per validare, testare e confrontare, su un gruppo di bambini in follow-up o con sospetto di infezione, due possibili metodologie per la genotipizzazione. In particolare è stata testata dapprima una metodica già validata nel nostro laboratorio sui DBS (73) che prevede l'uso della tecnica RFLP con l'enzima di restrizione MAE III (Roche), che permette di individuare i 4 genotipi del gene gB.

Successivamente è stata testata, con la collaborazione di un gruppo del LUMC (Olanda) anche una Real Time-PCR utilizzata sistematicamente presso il loro laboratorio sui DBS. La procedura prevede una Real Time qualitativa in-house di un campione di DBS estratto mediante kit commerciale (Qiagene).

3.4.1 Messa a punto RFLP su DSS

La tecnica RFLP prevede dapprima un'amplificazione in n-PCR di una regione specifica del gene gB. Tali primers, chiamati Pri-Did nel primo step e Car-Bar nel secondo, le cui sequenze sono riportate nella tabella 3.7, sono stati individuati mediante studi antecedenti effettuati presso il laboratorio in cui ho svolto il periodo di dottorato.

Sono dunque stati testati 4 campioni con genotipo gB noto: gB1 era costituito da una coltura cellulare di CMV ceppo Towne; gB2 da una coltura cellulare di CMV ceppo AD69; gB3 e gB4 erano dei tamponi salivari clinici precedentemente indagati per il ceppo gB.

All'interno di ciascuna provetta è stato inserito un tampone di nylon sterile, che è stato successivamente riposto nel proprio astuccio. Al fine di poter sovrapporre i risultati tra

campioni artificiali e clinici, tutti i tamponi sono stati lasciati a temperatura ambiente per almeno 24 ore.

PRIMERS ESTERNI:	
gB1 (F)	5' GATCTCCTGGGATATACAGGACG-3'
gB2 (R)	5' GAATRGCTGAYGGRTTGATCTTG-3'
PRIMERS INTERNI:	
gB3 (F)	5' ACYTTCTGGGAAGCCTCGGAACG-3'
gB4 (R)	5' GAGTTCCTTGAAGACCTCTAG-3'

Tab. 3.7: Sequenze dei primers per la n-PCR necessaria per l'RFLP

3.4.1.a Amplificazione e rilevazione dei genotipi mediante RFLP

Il giorno seguente sono stati aggiunti a ciascun DSS 100µl di H₂O sterile per biologia molecolare. Così idratati i campioni sono stati agitati su vortex per almeno 15 secondi e 5µl di soluzione sono stati utilizzati come template nella n-PCR, la cui mix è stata preparata secondo le indicazioni riportate in tabella 3.8.

Reagenti	Concentrazione richiesta	Quantità di reagente per provetta (volume finale mix di reazione: 50µl)
Acqua distillata sterile Dnasi RNasi-free		29.1µl per il I step
		32.1µl per il II step
10 x PCR, buffer	1 x PCR, Buffer	5µl
Primers (10pm/µl=10µM)	1µM	5µl
DNTPs (25mM x nucleotide)	200µM	0.4µl
TaqPolimerase (2U/µl)	1U	0.5µl
Estratto/prodotto della I amplificazione		5µl per il I step
		2µl per il II step

Tab 3.8 Lista reagenti e quantità necessarie alla preparazione della miscela di reazione per la n-PCR

Al termine della doppia amplificazione i risultati ottenuti sono stati evidenziati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%, secondo la metodica riportata nel paragrafo 3.1.1.b

I secondi amplificati dei campioni risultati positivi sono quindi stati testati mediante RFLP per poter individuare il genotipo di gB a cui appartenevano.

La miscela che permette il taglio enzimatico e quindi la separazione delle diverse bande di gB è così composta:

- 5µl di buffer
- 0.6µl dell'enzima di restrizione MAE III (Roche)

3.4.1.b Interpretazione dei risultati

L'evidenziazione dei prodotti del taglio sono visibili mediante una corsa elettroforetica su gel di agarosio al 3%. Un gel più denso permette infatti una miglior separazione delle bande che si posizioneranno ad altezze differenti a seconda del genotipo.

In particolare si distinguono per ciascun genotipo le bande alle altezze riportate nella tabella 3.9, nella figura 3.10 sono visibili le bande dei pesi molecolari indicati dal marker.

gB1	gB2	gB3	gB4
		313	
281			
		208	
			201
	191		
			162
158	158		158
	90		
82	82		

Tab 3.9: Posizione delle bande di genotipizzazione di gB

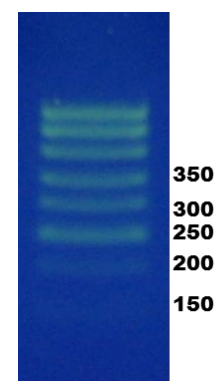


Fig. 3.10: Posizione delle bande del marker

Se alcune altezze non erano definibili in quanto non corrispondevano al peso molecolare di un genotipo specifico la prova veniva ripetuta. Se il risultato restava invariato e quindi non definibile si poteva supporre che quel campione contenesse più genotipi.

La tecnica RFLP non permette di individuare più genotipi contemporaneamente.

3.4.2 Messa a punto di una Real Time-PCR in-house per i genotipi gB e gH

Nel mese di Luglio del 2012, abbiamo contattato la Dott.ssa de Vries del LUMC richiedendo una collaborazione per poter utilizzare la Real Time in house messa a punto nel loro laboratorio per la genotipizzazione dei geni gB e gH sui DBS. La richiesta (allegato 4) prevedeva l'utilizzo della loro RT-PCR sui DSS in acqua da noi raccolti da alcuni bambini in follow up o con sospetto di infezione.

La validazione è stata eseguita a partire dagli stessi campioni utilizzati per la messa a punto della metodica in Italia. Infatti sia i campioni clinici che i controlli positivi del gene gB sono stati inviati per mezzo posta in Olanda in ghiaccio secco, al fine di garantirne l'integrità; per i due genotipi di gH sono stati utilizzati controlli positivi presenti nel loro laboratorio.

3.4.2.a Amplificazione mediante Real Time-PCR in-house presso LUMC, Olanda

La RT-PCR olandese (76) prevedeva l'analisi contemporanea dei quattro genotipi di gB e dei due genotipi di gH. Precisamente la rilevazione dei genotipi di gB era possibile grazie a una miscela multipla che conteneva i 2 primers, senso e antisenso, per ciascun genotipo. Allo stesso modo anche per i genotipi gH la miscela era una multipla e conteneva i 4 primers necessari all'amplificazione.

Le miscele di reazione sono state preparate come riportato nelle tabelle 3.10 e 3.11.

Ai 40µl di mix sono stati aggiunti 10µl di templat, costituito in questo caso dalle soluzioni dei controlli positivi.

La Real Time PCR (CFX96™ real time PCR detection, Biorad) è stata eseguita secondo le condizioni in uso nel loro laboratorio, riportate nella tabella 3.12. La HotStar taq master mix è della ditta Qiagen.

Elemento	Quantità
Hotstar mastermix	25µl
2221CMVtype1_s (50µM)	0,3µl
2222CMVtype1_as (50µM)	0,3µl
2223CMVtype2_s (50µM)	0,3µl
2224CMVtype2_as (50µM)	0,3µl
2225CMVtype3_s (50µM)	0,3µl
2226CMVtype3_as (50µM)	0,3µl
2227CMVtype4_s (50µM)	0,3µl
2228CMVtype4_as (50µM)	0,3µl
2516CMVgB1-TQ-FAM (50µM)	0,2µl
2517CMVgB2-TQ-YAK (50µM)	0,2µl
2506CMVgB3-XS-TXR (50µM)	0,2µl
2518CMVgB4-TQ-Q705 (50µM)	0,2µl
2519CMVgB4-TQ-Q705 (50µM)	0,2µl
MgCl2 25mM	6µl
H2O	5,6µl

Tab. 3.10: elenco e quantità degli elementi necessari per la miscela di reazione RT-PCR per i genotipi GB

Elemento	Quantità
Hotstar mastermix	25µl
2236CMVgH1_s (50µM)	0,3µl
2237CMVgH1_as (50µM)	0,3µl
2238CMVgH2_s (50µM)	0,3µl
2239CMVgH2_as (50µM)	0,3µl
2520CMVgH1-TQ-FAM (5µM)	2µl
2521CMVgH2-TQ-YAK (5µM)	2µl
MgCl2 25mM	6µl
H2O	3,8µl

Tab. 3.11: elenco e quantità degli elementi necessari per la miscela di reazione RT-PCR per gH

Cicli	Tempo	Temperatura
1x	15'	95°C
45X	30"	95°C
	30"	55°C
	30"	72°C

Tab. 3.12: Condizioni di temperatura e tempi di reazione della RT-PCR per i genotipi gB e gH

3.4.2.b Interpretazione dei risultati

I risultati ottenuti erano qualitativi e visualizzati mediante curve ad andamento logaritmico. Come per la Real Time in uso presso il nostro laboratorio (vedere i paragrafi 3.3.c e 3.3.d), la visualizzazione di curve al di sopra della linea soglia indica la positività del campione, mentre alla lettura di una determinata fluorescenza corrispondeva un genotipo specifico.

I fluorometri FAM, YAK, TXRED e Q704 sono stati utilizzati per evidenziare i quattro genotipi di gB, rispettivamente dal gB1 al gB4; mentre FAM e YAK rilevavano la presenza di gH1 e gH2

3.4.3 Popolazione in studio nella fase IV

La popolazione in studio in questa fase era costituita da 41 bambini in follow-up e 9 con sospetto d'infezione, giunti alla nostra attenzione nell'ambito della routinaria attività diagnostica. In particolare i campioni clinici sono stati così distribuiti:

GRUPPO L: 101 DSS raccolti in tempi diversi da 41 bambini di età compresa tra 24 giorni e 4 anni.

GRUPPO M: 9 DSS sono stati raccolti da 9 bambini con sospetto di infezione, con età compresa tra 1 e 17 giorni di vita. Le mamme di questi pazienti avevano una storia di siero conversione in gravidanza o i bambini presentavano una qualche sintomatologia associabile all'infezione congenita da CMV.

Tutti i campioni sono stati raccolti tra Novembre 2010 e Ottobre 2012.

Di tutti i bambini sono stati raccolti anche i tamponi salivari tradizionali che sono stati testati insieme ai DSS in n-PCR per l'amplificazione del gene gB (vedere paragrafo 3.1.1.a) e in Real Time commerciale (figura 3.11, vedere paragrafo 3.3.c).

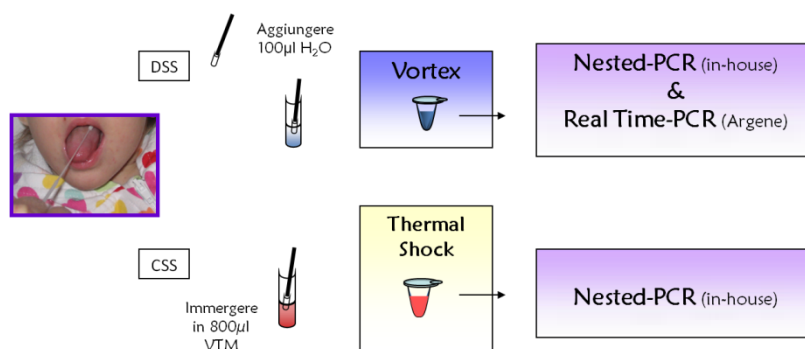


Fig. 3.11: Trattamento dei campioni dei gruppi L e M

I DSS, il cui risultato positivo era confermato dal corrispondente campione liquido, sono stati testati con una nested-PCR in house per l'amplificazione del gene gB in un'altra regione (primers, Pri, Did, Car, Bar; vedere paragrafi 3.4.1.a e 3.4.1.b) al fine di determinare il genotipo gB di appartenenza con la tecnica RFLP (figura 3.12).

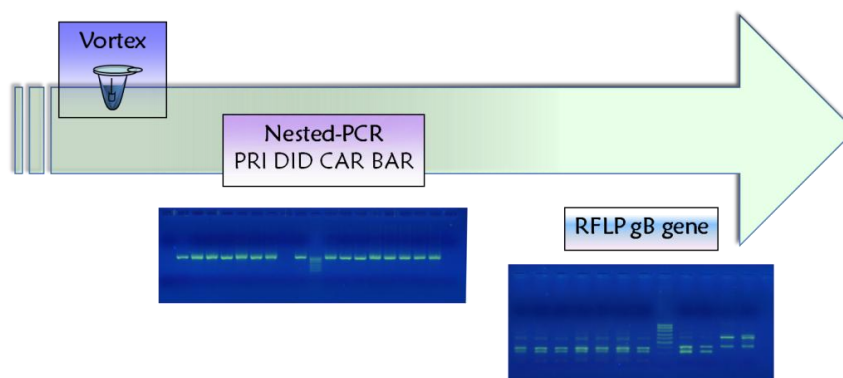


Fig. 3.12: procedura e trattamento dei DSS in RFLP

Successivamente tutti i DSS positivi sono stati inviati in ghiaccio secco in Olanda dove in seguito alla validazione sono stati amplificati con la Real Time-PCR in house specifica per i genotipi gB e gH in uso presso il loro laboratorio (vedere paragrafi 3.4.2.a e 3.4.2.b).

Tutti i campioni positivi inviati in Olanda sono stati testati tra il 24 Settembre e il 5 Ottobre 2012. Durante questo periodo i campioni sono stati processati come riportato nel paragrafo 3.4.2 e l'interpretazione dei risultati ottenuti è visibile al paragrafo 3.4.2.a.

4 RISULTATI

I risultati ottenuti sono stati suddivisi nelle quattro fasi corrispondenti a quelle individuate nei materiali e metodi.

4.1 Fase I

Nella prima fase, la validazione era stata effettuata preparando dei campioni artificiali di tamponi salivari secchi o mock-DSS (o mDSS) al fine di verificare se la conservazione del campione biologico a temperatura ambiente potesse comportare una qualche perdita dell'acido nucleico presente. Erano dunque state allestite delle diluizioni seriali in base 10 di una sospensione virale di CMV che titolava 10^7 copie/ml.

L'amplificazione mediante nested-PCR in house sui mDSS estratti con kit commerciale ha permesso la detenzione del CMV-DNA fino alla concentrazione di 10^1 copie/ml. In parallelo erano stati testati anche i campioni artificiali che simulassero rispettivamente l'analisi del tampone salivare in VTM o CSS in PCR e isolamento rapido.

Le analisi condotte sui mock-CSS (o mCSS) hanno mostrato che la visualizzazione del CMV-DNA mediante nested-PCR, a seguito di un'estrazione con shock termico, era possibile fino alla concentrazione di 10^2 copie/ml; la fluorescenza in isolamento rapido sullo stesso tipo di campione è invece stata rilevata fino alla concentrazione di 10^4 copie/ml.

Successivamente è stato messo a punto uno studio su bambini con infezione congenita da CMV accertata alla nascita (gruppo A o follow-up) e su un gruppo di bambini random arruolati presso l'Ospedale Mangiagalli, suddivisi in gruppo B e C a seconda dell'età. Erano stati arruolati, in totale 451 bambini di cui 41 sono stati scartati; a ciascuno dei

restanti 410 bambini sono stati raccolti un DSS e un CSS, e trattati secondo la metodologia già utilizzata al momento della validazione. I risultati positivi ottenuti nei diversi gruppi sono visibili nella tabella numero 4.1. la sensibilità riscontrata in tutti i gruppi è stata del 100%, la specificità tra DSS e CSS in n-PCR è stata del 58% circa nel gruppo follow-up e del 94% nei gruppi dei random. La specificità tra DSS e CSS in p72 del gruppo random è stata del 93%; nel gruppo follow-up del 31% circa.

Gruppo		Età	n° campioni testati	n° campioni positivi		
				CSS		DSS
				SV	n-PCR	QIA
A	Follow-up	14gg-6aa	45	28	38	41
B	Random	≤ 14 gg	313	5	6	21
C		≤ 45 giorni	52	1	3	8
TOTALE		1gg-6aa	410	34	47	70

Tab. 4.1: Campioni risultati positivi nei diversi gruppi di studio della fase I

4.2 Fase II

Nella seconda fase all'estrazione commerciale si è preferito lo shock termico, una metodica meno costosa. In parallelo con il trattamento di altri campioni secchi quali i DBS e i DUS (vedere paragrafi 2.12.f e 2.12.g) i DSS sono stati reidratati con 100µl di E-MEM sia nella fase di validazione che in applicazione alla casistica in studio.

Durante la validazione i mDSS, immersi ciascuno in una delle diluizioni seriali successive in base 10 di una sospensione virale che titolava 10^7 copie/ml, sono stati dapprima lasciati tal quali per 24 ore, reidratati e infine o solo vorticati o vorticati e sottoposti a shock termico. Dall'amplificazione mediante nested-PCR in house è risultato che sia i mDSS solo agitati che quelli sottoposti a shock termico erano in grado di rilevare il CMV-DNA fino alla concentrazione di 10^2 copie/ml. Sono stati testati contemporaneamente anche i

mCSS corrispondenti, che sono risultati in grado di detenere il CMV-DNA, a seguito di un'estrazione con shock termico e amplificazione con nested-PCR, fino alla concentrazione di 10^3 copie/ml.

Parallelamente le stesse metodiche sono state applicate ai tre gruppi di bambini, suddivisi in base all'età, alla storia clinica o alla frequenza della scuola materna o asilo nido. I campioni risultati positivi nei diversi gruppi sono visibili nella tabella 4.2. La sensibilità calcolata in tutti i gruppi è del 100% e la specificità del 98% circa. Più del 90% dei genitori dei bambini del gruppo E avevano aderito allo studio.

Gruppo		Età	n° campioni testati	n° campioni positivi		
				DSS		CSS
				Vortex	Shock termico	Shock termico
D	Follow-up	1m-6aa	34	33	33	32
E	scuola materna	3-5aa	92	8	8	7
	asilo nido	4m-3aa	49	26	26	26
F	infezioni sospette	1gg-5m	17	7	7	7
TOTALE		1gg-6aa	192	74	74	72

Tab. 4.2: Campioni risultati positivi nei diversi gruppi di studio della fase II

4.3 Fase III

In questa fase la determinazione della presenza del CMV-DNA nei DSS reidratati in E-MEM e vorticati e/o sottoposti a shock termico è stata possibile mediante l'uso di una Real Time-PCR di tipo commerciale.

Durante una fase preliminare, antecedente allo studio, era però risultato che la presenza del terreno colturale inibisse in qualche modo, l'amplificazione o la lettura dei fluorometri. La validazione è stata condotta su mDSS immersi a due a due in ognuna delle soluzioni seriali

in base 10 preparate a partire da una sospensione virale che titolava 10^7 copie/ml. Un mDSS di ogni coppia è stato reidratato con H₂O (mDSS-H) e l'altro con E-MEM (mDSS-M).

Tutti i mDSS sono stati agitati e un'aliquota è stata sottoposta anche a shock termico. I risultati ottenuti sui mDSS sia in acqua che E-MEM in nested-PCR hanno mostrato la capacità di rilevare la presenza del CMV-DNA fino alla concentrazione di 10^2 copie/ml. I mDSS-M sono risultati negativi per tutte le diluizioni indipendentemente dal trattamento quando amplificati con la Real Time-PCR.

Come ulteriore accertamento le stesse prove sono state effettuate su un gruppo di 5 bambini con infezione post-natale accertata (gruppo G, tabella 4.3). Anche in questo caso i DSS in E-MEM sottoposti a Real Time non sono stati in grado di rilevare la presenza del CMV-DNA (tabella 4.3).

Sono successivamente stati raccolti altri 59 DSS da bambini in follow-up (gruppo H) o con sospetto di infezione (gruppo I) reidratati solo con acqua. I risultati positivi ottenuti nei diversi gruppi sono visibili nella tabella 4.4.

Gruppo		n° campioni testati	NESTED-PCR				REAL TIME-PCR			
			DSS + H ₂ O		DSS + E-MEM		DSS + H ₂ O		DSS + E-MEM	
			Vortex	Shock termico	Vortex	Shock termico	Vortex	Shock termico	Vortex	Shock termico
G	infezione post natale (età: 24-30 mesi)	5	5	5	5	5	5	5	0	0

Tab. 4.3: Risultati della validazione su un gruppo di bambini sicuramente positivi. Confronto tra acqua e E-MEM

Gruppo		n° campioni testati	DSS + H ₂ O		CSS
			n-PCR	RT-PCR	n-PCR
G	infezione post-natale	5	5	5	n.t.
H	Follow-up	62	53	53	49
I	sospetti d'infezione	12	8	8	8
TOTALE	età: 1gg-2aa	79	66	66	57

Tab. 4.4: Campioni risultati positivi nei diversi gruppi in n-PCR; confronto tra DSS e CSS. Tutti i DSS sono stati reidratati in acqua.

I risultati dei DSS ottenuti sia in n-PCR che in RT-PCR sono perfettamente sovrapponibili. La sensibilità e la specificità nel gruppo H tra i DSS e i CSS sono risultate rispettivamente del 100% e del 69%. La sensibilità e la specificità del gruppo I sono risultate del 100%.

4.4 Fase IV

La quarta fase è stata svolta in parte presso il laboratorio di Virologia dell'Università degli Studi di Milano e in parte presso il LUMC (Olanda).

Nella prima fase di validazione la ricerca dei genotipi di gB è stata effettuata mediante la tecnica RFLP, mentre in Olanda è stato possibile rilevare i genotipi gB e gH mediante una Real Time-PCR in House.

Durante la validazione con RFLP i mDSS, immersi in sospensioni virali di CMV con un preciso genotipo di gB, sono stati in grado di rilevare il corretto genotipo. Allo stesso modo in Olanda tutti i genotipi ricercati sono stati evidenziati dall'amplificazione con RT-PCR (figure 4.1 e 4.2)

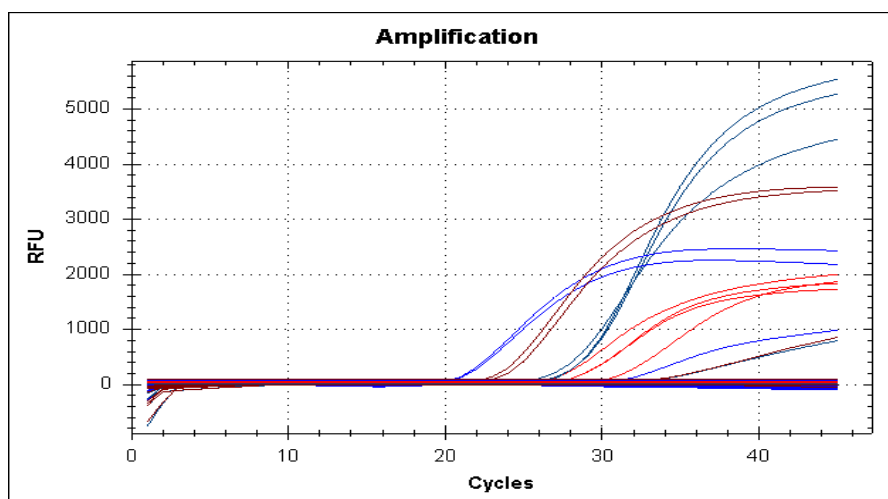


Fig. 4.1: curve di fluorescenza per i 4 genotipi gB

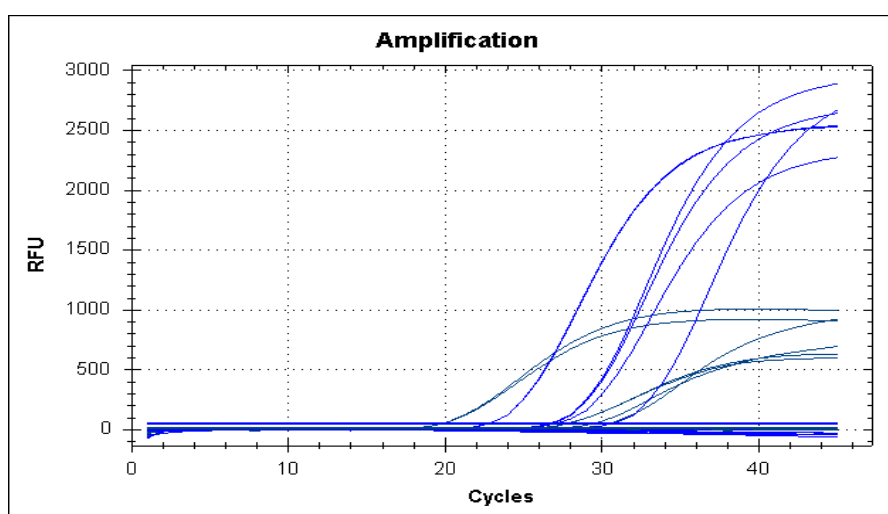


Fig. 4.2: curve di fluorescenza per i 2 genotipi di gH

Sono stati raccolti 101 DSS dal gruppo follow-up (gruppo L) e 9 DSS da bambini con sospetto di infezione (gruppo M).

Tutti i DSS sono stati testati dapprima per la ricerca di CMV con la n-PCR in uso presso il nostro laboratorio che amplifica una regione del gene gB (vedere paragrafo 3.1.1.a). Sono risultati positivi 95 DSS del gruppo L e 5 del gruppo M.

Successivamente i campioni positivi sono stati amplificati, a partire dal DSS originale con una differente nested-PCR, necessaria per il taglio enzimatico (vedere paragrafo 3.4.1, 3.4.1.a e 3.4.1.b).

Sono risultati positivi a questa seconda amplificazione 84 DSS del gruppo L e 4 del gruppo M, ponendo la percentuale di negativi al 9%.

Nei gruppi L e M sono stati tipizzati 81 e 3 DSS rispettivamente. Di 4 campioni positivi in n-PCR non è stato possibile determinare il genotipo, in quanto le bande non erano posizionate all'altezza attesa; essi rappresentano il 4% della popolazione in studio.

I risultati complessivi ottenuti con la tecnica RFLP e la distribuzione percentuale dei diversi genotipi è visibile nel grafico 4.1.

Il genotipo gB1 risulta essere quello maggiormente presente nella popolazione presa in esame(36%), seguito dal genotipo gB2 (22%). I genotipi gB3 e gB4 risultano distribuiti circa in egual misura nella popolazione in studio (14 e 15% rispettivamente).

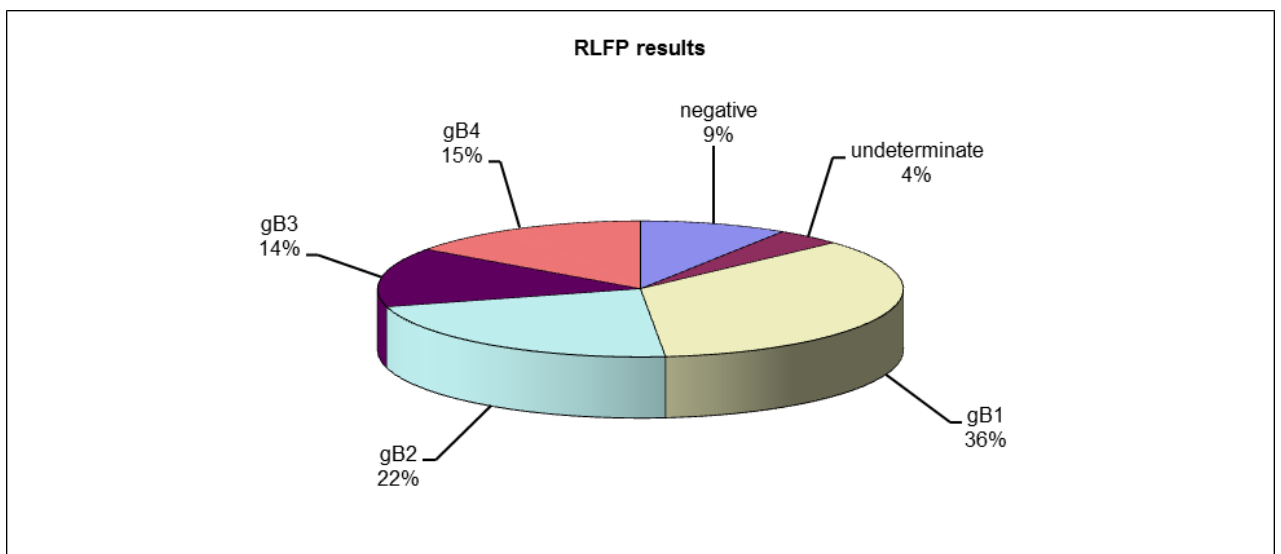


Grafico 4.1: Lo schema a torta qui riportato evidenzia la distribuzione complessiva dei diversi genotipi. Il genotipo più frequente risulta essere il gB1

I risultati ottenuti in Real Time-PCR in house sono riassunti nella tabella 4.5 e nel grafico 4.2

Tutti i campioni sono risultati positivi per almeno un genotipo eccetto 4, pari al 4% circa dei campioni in studio.

Il 2% circa dei campioni positivi non presenta alcun genotipo gH, mentre il 5% circa nessun genotipo di gB. Nel restante 89% dei campioni è stato possibile rilevare sia il genotipo gB che il genotipo gH. L'associazione più frequente è risultata essere quella tra il genotipo gB1 e gH2 (vedere tabella 4.5).

Il genotipo predominante per il gene gB è risultato essere, come è visibile nel grafico 4.2 il gB1 presente nel 34% dei campioni; mentre per i genotipi gH il più presente è gH1 con il 48%, come è visibile nel grafico 4.3.

Genotipi di gB	Genotipi misti	Genotipi gH			
		gH1	gH2	gH1/gH2	no gH
gB1		14	16	3	1
	gB1/gB2	1	5	1	0
	gB1/gB3	0	1	1	0
gB2		10	7	0	1
	gB2/gB3	1	0	1	0
gB3		12	1	0	0
	gB3/gB4	0	0	1	0
gB4		6	2	0	0
	gB1/gB3/gB4	0	2	0	0
	gB2/gB3/gB4	0	1	0	0
no gB		4	0	1	0

Tab. 4.5 Risultati dei genotipi gB e gH nei DSS nella popolazione in studio (gruppi L e M)

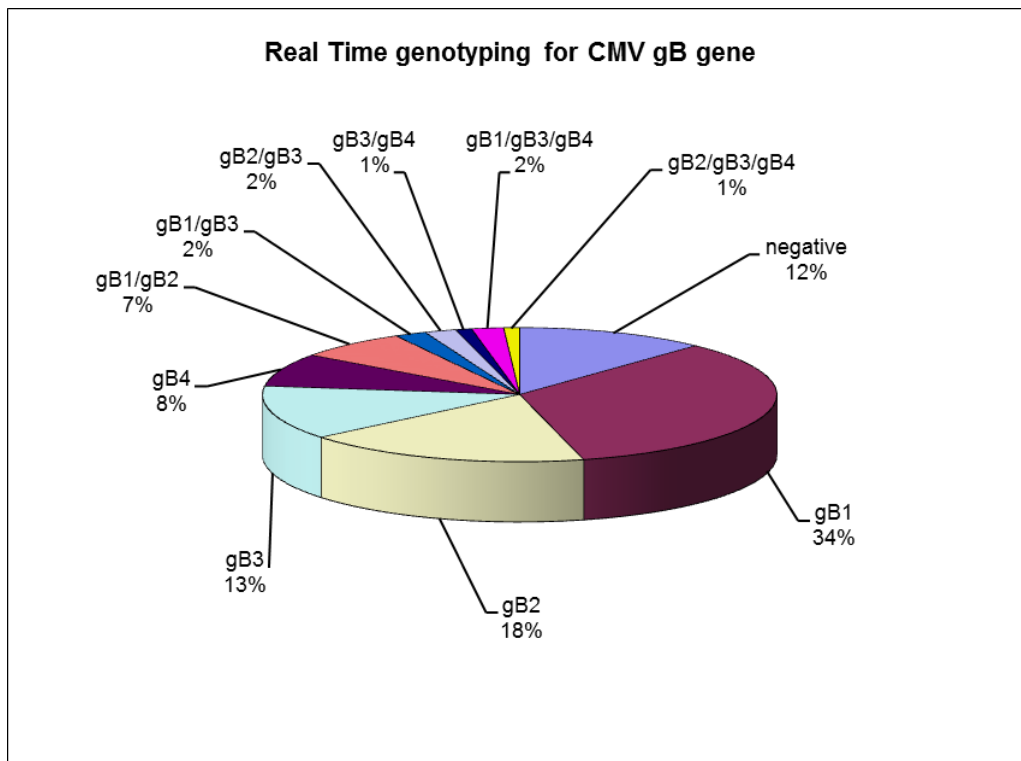


Grafico 4.2: Risultati ottenuti in RT-PCR dall'analisi dei campioni per il genotipo gB

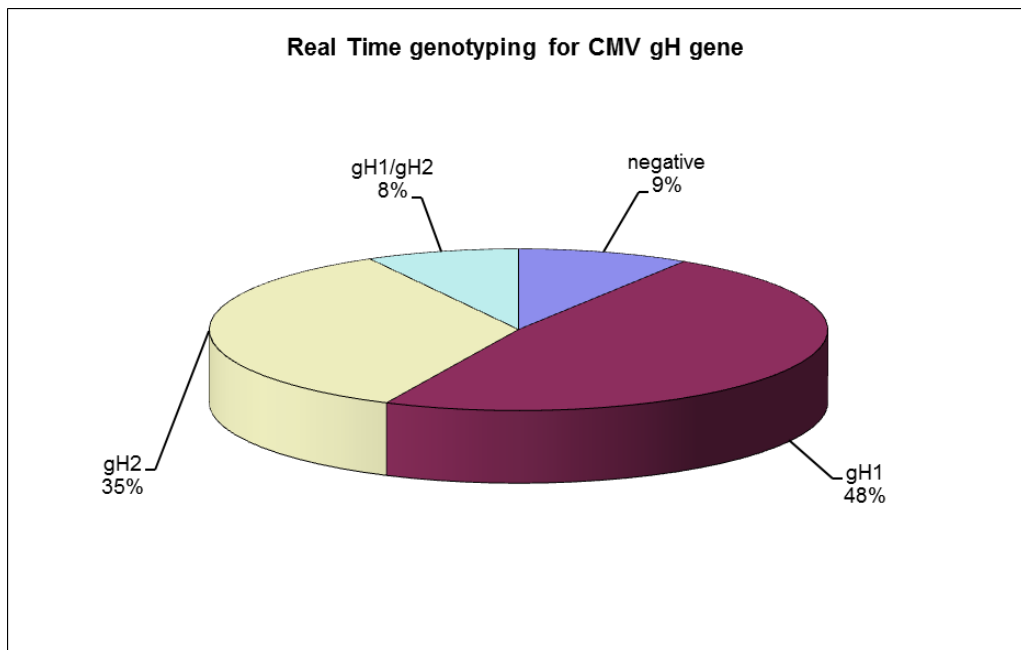


Grafico 4.3: Risultati ottenuti in RT-PCR dall'analisi dei campioni per il genotipo gH

Circa l'11.6% dei campioni è risultato avere un genotipo misto solo per gB, il 3% è risultato misto solo per gH e il 4.2% è risultato avere un genotipo misto sia per gB che per gH.

Inoltre circa il 3% dei campioni con genotipi misti di gB è risultato positivo per tre diversi genotipi di gB contemporaneamente; tutti questi campioni erano anche positivi per il genotipo gH2. Il genotipo misto più frequente è risultato essere gB1/gB2-gH2, come visibile nel grafico 4.4.

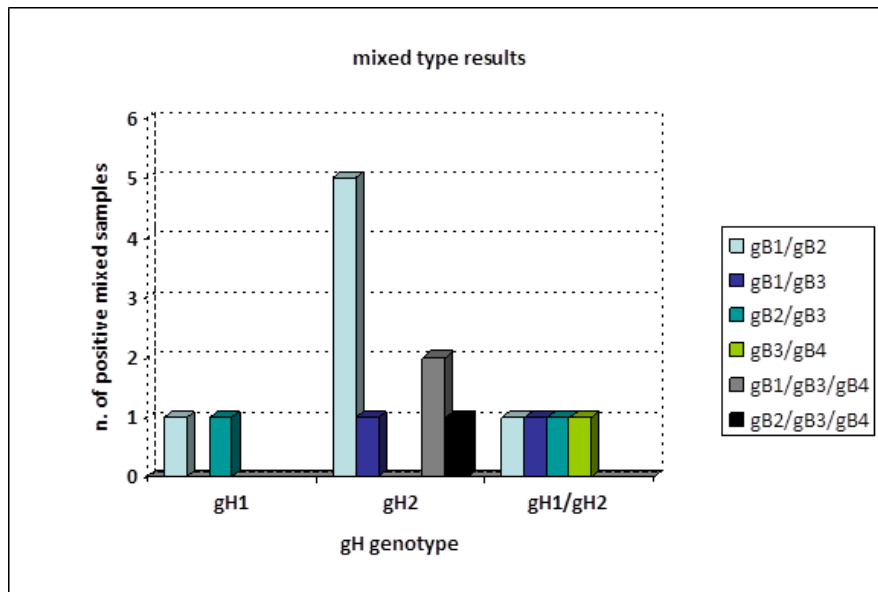


Grafico 4.4: Istogramma raffigurante i genotipi misti di gB. Il genotipo misto più frequente è il gB1/gB2

5 CONCLUSIONI

Il Cytomegalovirus è una delle maggiori cause di infezione congenita nell'uomo ed è un grave problema di sanità pubblica.

È difficile fare una diagnosi clinica, soprattutto per l'elevato numero di soggetti asintomatici (90%) o con sintomatologia aspecifica alla nascita.

Complessivamente nel corso dell'infanzia, circa un quinto di questi va incontro a morte o a gravi sequele permanenti, come sordità neurosensoriale e ritardo psicomotorio, che è possibile correggere efficacemente solo se si interviene tempestivamente.

Quindi è essenziale individuare precocemente i neonati infetti: la diagnosi virologica effettuata mediante isolamento virale in coltura cellulare da campioni biologici, quali urine e saliva, raccolti entro le prime due settimane di vita rappresenta l'unico valido mezzo di prevenzione attualmente disponibile. Infatti non si hanno ancora a disposizione né vaccini sicuri ed efficaci, in grado di garantire una protezione verso tutti i ceppi di CMV, né terapie antivirali specifiche.

È stato dimostrato che la reazione a catena della polimerasi (PCR) è un metodo sensibile e specifico per la rilevazione del CMV-DNA nelle urine (72) e sulla saliva (7), quindi può essere usata efficacemente per diagnosticare l'infezione congenita da CMV ed eventualmente per uno screening neonatale essendo i test semplici e rapidi.

Nel contempo, diversi studi hanno dimostrato che l'estrazione del DNA virale da campioni di sangue neonatale seccato (DBS, Dried Blood Spot) su carta da filtro (Guthrie card), raccolto routinariamente per lo screening delle malattie genetiche e metaboliche, seguita da una nested-PCR (DBS-test), costituisce una potente strategia per ovviare a diversi problemi legati al metodo convenzionale di isolamento virale in coltura cellulare (70).

In particolare, i campioni secchi, come è stato dimostrato per i DBS, richiedono ridotte quantità di campione e possono essere facilmente allestiti, conservati ed analizzati, risultando idonei anche a studi epidemiologici su larga scala ed a screening neonatali universali. Possono anche essere eventualmente spediti consentendo il loro esame in laboratori distanti dal luogo di nascita o da quello di conservazione del campione. Inoltre permettono di attribuire un'origine virale congenita ad infezioni accertate dopo il primo mese di vita, consentendo di formulare prognosi più accurate o di evidenziare l'eziologia di quadri morbosi di origine ignota o controversa come nel caso dei difetti della migrazione neuronale.

La dimostrazione dell'efficacia diagnostica della ricerca del CMV-DNA, sia su urine e saliva mediante la PCR sia su sangue essiccato, ha suggerito di verificare la possibilità di applicare queste stesse metodiche alla saliva essiccata (DSS-test, Dried Saliva Swab -test), al fine di facilitare la raccolta e la conservazione di questo campione biologico, già ritenuto idoneo per la diagnosi di infezione congenita (7). Di conseguenza, se il DSS-test si rivelasse valido almeno quanto il DBS-test, si potrebbero trarre tutti i vantaggi a quest'ultimo correlati, tra cui la possibilità di effettuare diagnosi retrospettive.

La possibilità di usare un campione di partenza con cariche virali notoriamente più elevate rispetto al sangue, come la saliva, consentirebbe anche l'utilizzo di procedure automatizzate come la Real Time-PCR (o RT-PCR). Quest'ultima metodica seppur utilizzata anche sui DBS, ha mostrato una bassa sensibilità nei casi in cui il campione di partenza avesse una carica virale uguale o inferiore a 10^3 copie/ml (6)

Lo scopo primario della presente tesi è stato quindi quello di confrontare il DSS-test con il metodo di riferimento di isolamento rapido in coltura cellulare (IR-p72) eseguito in parallelo ai corrispondenti campioni di saliva liquida per la diagnosi di infezione congenita

da CMV. Questi ultimi campioni sono stati saggiati anche con un test molecolare di nested-PCR, dal momento che il DSS-test prevede questa stessa metodica di amplificazione. Successivamente si è cercato di ridurre i costi e i tempi di esecuzione, per poter adattare il test ad un'eventuale screening neonatale.

Scopo secondario di questa tesi è stato quello di ricercare un fattore di prognosi negativa, quale può essere il genotipo di CMV infettante.

Per perseguire questi obiettivi, il lavoro è stato suddiviso in quattro fasi, ciascuna suddivisa in un primo step di validazione e uno successivo di applicazione su campioni clinici.

Nella prima fase i tamponi salivari secchi o DSS sono stati estratti con una metodologia che prevedeva l'uso di un'estrazione commerciale e l'amplificazione mediante nested-PCR (o n-PCR); nella seconda fase è stato validato e testato l'uso di un'estrazione meno costosa quale lo shock termico.

Le validazioni di entrambe le fasi presupponevano il confronto su campioni artificiali tra DSS e saliva liquida (o CSS, Classical Saliva Swab) processata sia secondo la metodica di riferimento (isolamento rapido, IR-p72) che con la procedura utilizzata generalmente nel nostro laboratorio (estrazione con shock termico e amplificazione con n-PCR in-house). I risultati ottenuti in entrambe le fasi hanno mostrato che il DSS-test, qualora applicato a concentrazioni decrescenti di virus, è in grado di rilevare la presenza del CMV-DNA a concentrazioni più basse rispetto a quelle individuate dai test classici su CSS.

Nella seconda fase i DSS una volta reidratati sono stati agitati e testati nuovamente. Anche l'assenza di un'estrazione vera e propria ha dato risultati del tutto sovrapponibili a quelli ottenuti sui DSS estratti con lo shock termico.

Un tale risultato può essere attribuito alla minor diluizione del campione secco e/o ad una maggior sensibilità dei metodi di estrazione: il DSS-test su campioni artificiali con

l'estrazione commerciale e shock termico ha permesso la visualizzazione del DNA virale fino alla concentrazione di 10^1 e 10^2 copie/ml rispettivamente, contro le concentrazioni 10^4 e 10^3 copie/ml rilevate dall'isolamento rapido e dallo shock termico su CSS.

L'applicazione della metodica con kit commerciale (fase I) è stata applicata ad una numerosa popolazione di neonati fisiologici e a un gruppo di bambini con infezione da CMV accertata, che costituivano il gruppo *controllo positivo*. Sui campioni clinici la sensibilità tra il DSS-test e il CSS testato in isolamento o in n-PCR è risultata per tutti i gruppi del 100%. La specificità è risultata essere più bassa attestandosi nel gruppo dei bambini random su valori vicini al 94% sia confrontando il DSS-test con i CSS processati in isolamento che in n-PCR. I dati di specificità riscontrati sono attesi se si considerano i risultati ottenuti in fase di validazione: la presenza di falsi positivi può essere giustificata dalla maggior sensibilità insita nel DSS-test, nel gruppo dei follow-up, ad esempio, la specificità è risultata del 57% circa, ma il gruppo era costituito da bambini la cui positività era stata precedentemente accertata.

Nella seconda fase il DSS-test, che consisteva nell'estrazione con shock termico (o st) e nell'amplificazione con nested-PCR, è stato applicato ad un gruppo di bambini frequentanti la scuola materna o l'asilo nido, in quanto notoriamente l'infezione da CMV, seppur asintomatica e poco pericolosa, è tipica nell'età prescolare (76). Parallelamente sono stati indagati anche un piccolo gruppo di neonati con sospetto di infezione che bambini in follow-up. Con l'occasione è stato previsto anche un incontro esplicativo con i genitori che si sono mostrati molto interessati, partecipando numerosi. È emerso che molti erano del tutto ignari del potenziale pericolo in gravidanza dell'infezione da CMV e delle semplici misure da adottare come prevenzione. I risultati ottenuti dai test sono stati espressi

in forma aggregata durante l'incontro nella scuola materna e per mezzo di una lettera a tutti i genitori dell'asilo nido.

A tutti i bambini coinvolti nello studio è stato raccolto, oltre al DSS, anche un tampone classico, per poter confrontare i dati ottenuti con il corrispondente CSS estratto anch'esso con shock termico (CSS-test); in questo caso sono stati confrontati esclusivamente i metodi di biologia biomolecolare.

Come atteso circa il 50% dei bambini tra i 4 mesi e i 3 anni di età sono risultati positivi al DSS-test e al CSS-test.

In tutti i gruppi i risultati ottenuti sul DSS solo agitato e DSS agitato ed estratto con st sono perfettamente sovrapponibili, così come tra DSS e CSS. Ciò ci ha permesso di considerare quest'ultimi trattamenti come idonei per la diagnosi da CMV. Ai fini di uno screening neonatale è da considerarsi fondamentale, oltre all'accuratezza del test e l'aspetto economico, che con l'utilizzo dello shock termico al posto dell'estrazione commerciale viene soddisfatto, anche i costi in termini di tempo intesi come velocità del test e impegno degli operatori. A tal proposito una tecnica automatizzabile è auspicabile.

Nella terza fase l'amplificazione con nested-PCR è stata sostituita da una Real Time-PCR (RT-PCR). Quest'ultima consente di rilevare la presenza del CMV-DNA in due ore circa, contro le tre/quattro impiegate per la n-PCR. Inoltre è possibile ottenere anche risultati in termini di carica virale. In quest'ultima fase di messa a punto della metodica ci siamo resi conto che utilizzando il terreno di coltura E-MEM per reidratare i tamponi secchi, non era possibile eseguire la RT-PCR, in quanto questa risultava in qualche modo inibita. Al momento della validazione si è dunque deciso di procedere parallelamente anche con l'idratazione in acqua. I risultati della validazione su campioni positivi artificiali e su un ristretto gruppo di bambini positivi hanno mostrato che i DSS in acqua sia solo agitati che

estratti con st, possono essere testati sia in RT-PCR che in n-PCR, mentre i DSS immersi in E-MEM permettono la rilevazione del DNA virale sono in n-PCR. Come atteso anche il DSS-test con tamponi secchi reidratati in acqua ha rilevato la presenza del CMV-DNA in diluizioni successive di una sospensione virale, fino alla concentrazione 10^2 copie/ml. I test effettuati anche su un gruppo in follow-up e uno di bambini con sospetto di infezione ha confermato l'affidabilità del DSS-test in acqua sia in nested che Real Time-PCR. Come avvenuto nelle altre fasi, la specificità riscontrata nel gruppo dei follow-up è risultata più bassa, rispetto agli altri gruppi, essendo del 70%. Ciò può essere dovuto ancora una volta alla bassa carica virale presente nel campione di partenza e alla maggior diluizione a cui sono sottoposti i CSS. Va considerato che nel gruppo dei follow-up sono presenti bambini di età molto diverse, tra cui bambini con infezione congenita accertata che al momento del prelievo avevano 3 o 4 anni. È perciò plausibile che i *falsi positivi* riscontrati confrontando i DSS e i CSS siano dovuti a queste ragioni e non all'inaffidabilità del test.

Dai risultati finora discussi il DSS-test, che prevede la raccolta con un tampone in nylon della saliva, la sua reidratazione con acqua, l'agitazione mediante vortex e la ricerca del Cytomegalovirus con Real Time-PCR commerciale, risulta essere un valido test per la rilevazione del CMV-DNA in tempi rapidi e con costi contenuti, candidandosi, a seguito di ulteriori indagini su larga scala, come possibile test per lo screening neonatale. La messa a punto di una RT-PCR in house potrebbe inoltre abbassare ulteriormente i costi necessari all'esecuzione dell'analisi.

Scopo secondario di questa tesi era quello di utilizzare il DSS-test come base per la ricerca di un fattore di prognosi negativa. A tal proposito è stata richiesta la collaborazione della Dott.ssa de Vries, presso il LUMC di Leiden, Olanda. Da studi precedenti era emerso che un possibile fattore di prognosi può essere determinato dal genotipo infettante; ad esempio

alcuni autori hanno riscontrato una associazione tra il genotipo gB3 e le sequele più gravi (77). L'analisi era stata condotta mediante tecnica RFLP su DBS, ma l'associazione non era risultata statisticamente significativa.

Dapprima è stato effettuato il test RFLP sui DSS su campioni artificiali e successivamente su 110 tamponi secchi raccolti da 41 bambini in follow-up e 9 con sospetto di infezione. 100 DSS sono risultati positivi in n-PCR. Tuttavia per applicare la tecnica RFLP e utilizzare l'enzima di restrizione MAE III (Roche) è stato necessario amplificare il campione con una diversa n-PCR, che è risultata essere meno sensibile rispetto alla n-PCR utilizzata nelle altre fasi essendo stata in grado di rilevare la presenza del CMV-DNA nel circa 88% dei campioni positivi. Di questi è stato possibile genotipizzare il 96% dei DSS e del restante 4% non è stato possibile definire il genotipo. Inoltre la tecnica RFLP è laboriosa e sono necessarie più di 8 ore lavorative per ottenere i risultati.

Essendo stata messa a punto una Real Time-PCR in-house per la determinazione dei genotipi gB e gH di CMV su DBS nel laboratorio Olandese sopra citato si è richiesta la loro collaborazione per testare gli stessi DSS. Dopo la messa a punto e visti i risultati incoraggianti dei primi test sono stati testati tutti i campioni risultati positivi scegliendo di testare anche i 12 campioni discordanti tra le due diverse n-PCR. La Real Time-PCR ha rilevato la presenza di almeno un genotipo anche in 5 DSS risultati negativi in RFLP, mentre in 3 DSS positivi in RFLP non ha rilevato la presenza di alcun genotipo. Questo può essere dovuto alla bassa carica virale del campione e alla minore sensibilità della RT-PCR di individuare i genotipi gB3 e gB4. Nel 19% dei casi si sono riscontrati dei genotipi misti per gB o gH o entrambi. In particolare è da evidenziare che nell'8% dei casi il genotipo gH risultava presente nelle sue due forme; nel 12% dei casi erano presenti almeno 2 genotipi di gB e nel 3% erano visibili tre genotipi di gB.

I risultati ottenuti sono molto promettenti e interessanti; è necessario però terminare l'approfondimento dei dati relativi all'anamnesi dei pazienti presi in oggetto in questo studio al fine di determinare l'eventuale associazione tra il/i genotipi presenti nel campione e le eventuali sequele. In questi mesi si stanno inoltre eseguendo le analisi genotipiche delle urine e del DBS alla nascita dei bambini in follow-up, al fine di definire, come indicato da altri autori da analisi su saliva liquida, urine e sangue (78) se durante la prima infanzia essi sono soggetti a infezione multiple con altri genotipi. È tuttavia da chiarire se tali infezioni siano causa di sequele più o meno gravi. È dunque auspicabile approfondire ulteriormente quest'aspetto studiando una casistica maggiore e confrontando nello stesso momento i campioni di saliva, urine e sangue, per poter chiarire ulteriormente le dinamiche delle co-infezioni e reinfezioni nei casi di cCMV.

In conclusione, la facile esecuzione del DSS-test, con l'assenza di estrazione e l'automatizzazione dell'amplificazione mediante RT-PCR consentirebbe, se raccolto sistematicamente alla nascita l'individuazione precoce di tutti quei bambini infetti asintomatici che altrimenti non verrebbero indagati. Ciò permetterebbe una sensibile riduzione nei costi della Sanità Pubblica. L'uso di un campione ad alta carica virale quale la saliva, di facile raccolta e, se secco, di facile trasporto e conservazione, in cui oltre alla diagnosi qualitativa è possibile effettuare anche un'analisi quantitativa e di genotipizzazione, apre numerose prospettive oltre allo screening, ad esempio per la ricerca di un fattore di prognosi negativa quale può essere il genotipo infettante o la carica virale. Ciò permetterebbe di individuare tempestivamente tutti gli infetti ed intervenire in modo mirato.

6 ALLEGATI

Allegato 6.1: Modulo informativo e consenso informato (fase I)



FONDAZIONE
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
MANGIAGALLI
E REGINA ELENA

DIPARTIMENTO PER LA SALUTE DELLA DONNA, DEL BAMBINO E DEL NEONATO

U.O. DI NEONATOLOGIA E TERAPIA INTENSIVA NEONATALE
ISTITUTO DI PEDIATRIA E NEONATOLOGIA – UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
DIRETTORE: PROF. FABIO MOSCA

Consenso Informato relativo allo studio:

“Screening neonatale per la diagnosi di infezione congenita da Cytomegalovirus: utilità di un test basato sulla determinazione del DNA virale su campioni biologici essiccati.”

Gentili Genitori,

vi chiediamo di poter inserire il vostro bimbo in uno studio che si sta svolgendo presso la Neonatologia e Terapia Intensiva Neonatale della Clinica Mangiagalli, in collaborazione con la Sezione di Virologia del Dipartimento di Sanità Pubblica-Microbiologia-Virologia dell'Università di Milano.

L'obiettivo dello studio è quello di confermare l'attendibilità di un test di laboratorio basato sulla ricerca del Cytomegalovirus (CMV) su urina seccata su carta da filtro (ricerca del DNA virale), con il fine ultimo di proporre questo test come test di screening nel neonato per l'infezione congenita da CMV.

L'infezione da CMV è diffusissima e nella maggior parte degli individui non provoca sintomi di malattia. Dopo l'infezione primaria il virus rimane latente nell'organismo e si può riattivare anche dopo anni. Durante la gravidanza, in seguito ad una infezione primaria o alla riattivazione del virus latente, si può verificare il passaggio del virus al feto attraverso la placenta, con possibile infezione fetale.

Il CMV rappresenta una delle cause più frequenti di infezione congenita; nella maggior parte dei casi l'infezione alla nascita è asintomatica, ma danni possono insorgere a distanza anche nei bimbi che alla nascita non presentano sintomi. Se questi ultimi fossero identificati alla nascita,



FONDAZIONE
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
MANGIAGALLI
E REGINA ELENA

DIPARTIMENTO PER LA SALUTE DELLA DONNA, DEL BAMBINO E DEL NEONATO

U.O. di NEONATOLOGIA E TERAPIA INTENSIVA NEONATALE
ISTITUTO DI PEDIATRIA E NEONATOLOGIA – UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
DIRETTORE: PROF. FABIO MOSCA

potrebbero essere seguiti con un follow-up mirato che consentirebbe di mettere in atto prontamente gli interventi di correzione e riabilitazione necessari.

Il virus nei bimbi che si sono infettati in utero viene eliminato particolarmente con le urine; per questo motivo il campione biologico per eccellenza per fare diagnosi di infezione congenita da CMV è proprio l'urina. In questo studio si vogliono confrontare i risultati del test eseguito sull'urina fresca con quelli eseguiti su urina seccata su carta; raccogliere l'urina su una lista di carta assorbente posizionata all'interno del pannolino è sicuramente un metodo più semplice e pratico rispetto alla raccolta tradizionale con il sacchetto.

Se darete il vostro consenso per la partecipazione di vostro figlio a questo studio, saranno raccolti al vostro bimbo un campione di urina con il sacchettino e l'urina che bagna una lista di carta assorbente inserita all'interno del pannolino in occasione di un cambio, senza alcun disturbo per il bimbo.

Possibili rischi: lo studio non comporta alcun rischio per il vostro bambino.

Potenziati benefici: in caso di positività all'esame, il vostro bimbo sarà inserito, se lo vorrete, in un programma di follow-up e potrà trarre vantaggio dalla diagnosi precoce di eventuali danni a distanza.

Riservatezza: la partecipazione di vostro figlio a questo studio rimarrà riservata, tutte le informazioni e i dati raccolti saranno confidenziali.

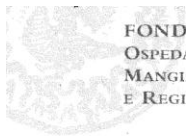
Partecipazione volontaria: la partecipazione a questo studio è totalmente volontaria

Il Responsabile dello studio

Dott.ssa Lorenza Pugni

Il Direttore dell'U.O. di Neonatologia e
Terapia Intensiva Neonatale

Prof. Fabio Mosca



FONDAZIONE
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO
MANGIAGALLI
E REGINA ELENA

DIPARTIMENTO PER LA SALUTE DELLA DONNA, DEL BAMBINO E DEL NEONATO

U.O. DI NEONATOLOGIA E TERAPIA INTENSIVA NEONATALE
ISTITUTO DI PEDIATRIA E NEONATOLOGIA – UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
DIRETTORE: PROF. FABIO MOSCA

Autorizzazione

Abbiamo letto il modulo di consenso e ricevuto tutte le informazioni che abbiamo richiesto; nella nostra qualità di esercenti la patria potestà sul minore _____ manifestiamo il nostro consenso affinché nostro figlio partecipi allo studio sopra descritto.

Confermiamo che ci sono stati spiegati i suoi obiettivi, il modo in cui si svolge e i possibili rischi/benefici.

1. Genitore _____
firma _____

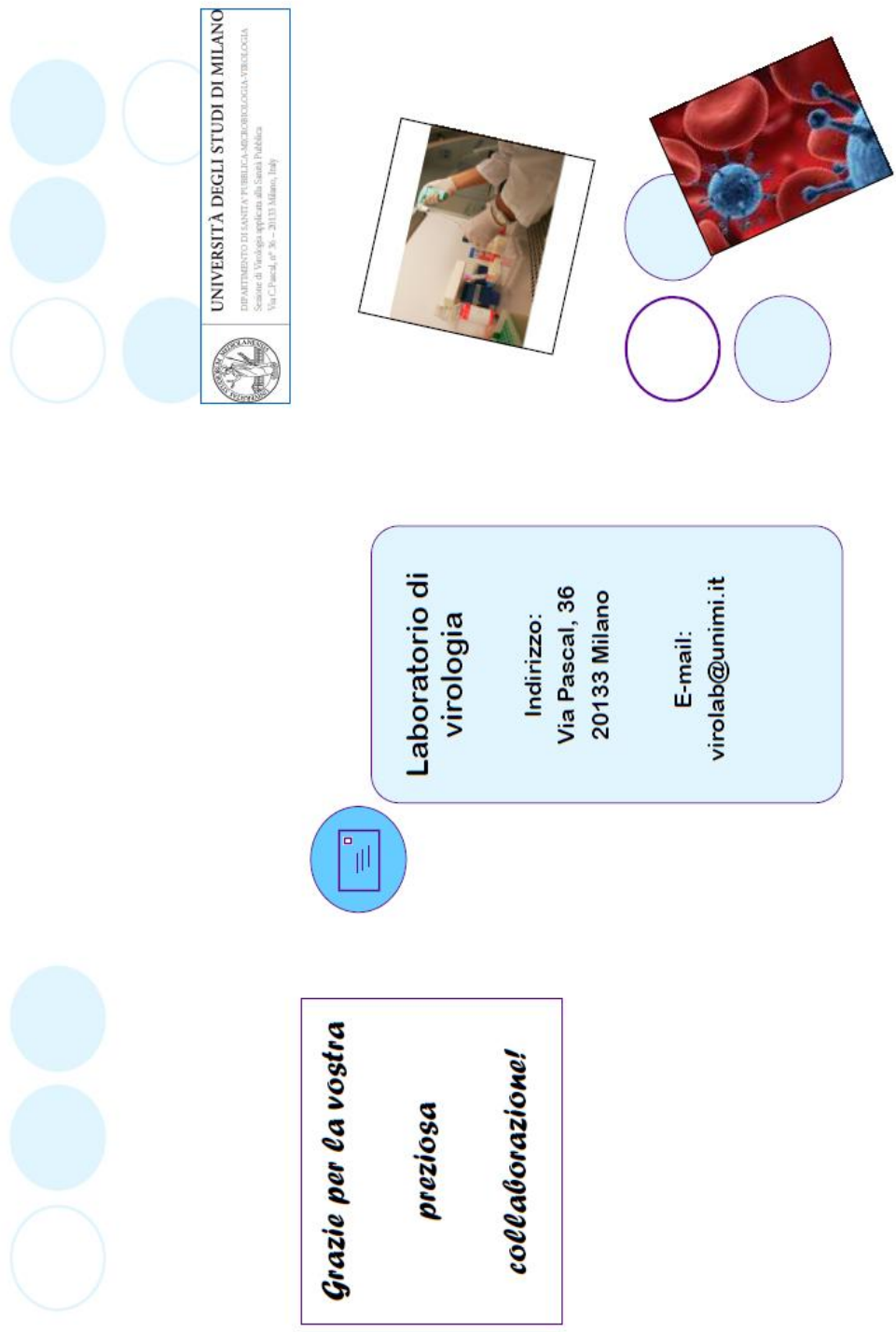
2. Genitore (o esercente la potestà) _____
firma _____

Io sottoscritto Dott. _____ ho spiegato ai genitori del piccolo _____ lo scopo, i rischi e i benefici della partecipazione a questo studio.

Firma del medico _____

Data _____

Allegato 6.2: volantino informativo per le scuole



The flyer features several decorative elements: a row of four light blue circles at the top left; a row of three light blue circles at the top right; a row of three light blue circles at the bottom left; and a row of two light blue circles at the bottom right. A central light blue rounded rectangle contains contact information. A white rectangular box at the bottom left contains a thank-you message. A circular icon with an envelope symbol is positioned to the left of the contact information box. Two images are placed on the right side: a photograph of a person in a lab coat working in a laboratory, and a graphic illustration of red blood cells and blue virus particles.

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA, MICROBIOLOGIA E VIRELOGIA
Scienze di Virologia applicata alla Sanità Pubblica
Via Pascal, n° 36 - 20133 Milano, Italy

Laboratorio di virologia
Indirizzo:
Via Pascal, 36
20133 Milano
E-mail:
virolab@unimi.it

Grazie per la vostra preziosa collaborazione!



Cari genitori,

siamo un gruppo di ricercatori del Dipartimento di Sanità Pubblica-Microbiologia-Virologia dell'Università degli Studi di Milano. La nostra attività di ricerca è indirizzata soprattutto a studiare la diffusione e i metodi per la prevenzione delle malattie virali. Il virus di maggior interesse per noi è il citomegalovirus (CMV), un virus molto diffuso ma poco conosciuto dal grande pubblico. In genere l'infezione da CMV passa inosservata e solo raramente è accompagnata da lievi sintomi simil-influenzali che si risolvono in breve tempo e senza danno. Tuttavia nel soggetto con il sistema immunitario compromesso (es. paziente trapiantato) o ancora immaturo (feto durante la gravidanza) CMV è in grado di provocare malattie anche gravi o danni permanenti. Ad oggi non sono ancora disponibili vaccini anti-CMV e la prevenzione dell'infezione si basa sull'adozione di semplici misure igieniche che riducono il rischio di venire a contatto con il virus.

Cosa studiamo

Stiamo mettendo a punto una tecnica innovativa, basata sull'analisi di campioni di saliva, per individuare, anche in soggetti senza sintomi, la presenza del virus.

Perché chiediamo la vostra collaborazione?

- Il CMV infetta frequentemente i bambini piccoli e dopo l'infezione continua ad essere presente nella loro saliva per molti mesi*.
- La raccolta della saliva è facile, non comporta alcun disagio per il bambino e non richiede l'intervento di personale specializzato.

Se acconsentirete al prelievo di un po' di saliva del vostro bimbo (con due piccoli tamponi morbidi e sterili) potremo verificare il funzionamento del nostro test ... e vi saremo molto molto grati!

*NB: per tutto questo tempo i bambini con CMV non hanno problemi né sintomi che li distinguano dagli altri.

Cosa faremo

- Vi chiederemo di firmare il modulo per il consenso informato per l'adesione a questo piccolo studio pilota. **L'adesione è assolutamente libera.**
- Un nostro incaricato, nell'orario di scuola, preleverà la saliva al vostro bimbo in presenza di personale della scuola (*o, se preferite, in vostra presenza*).

I tamponi saranno identificati solo con una sigla (accompagnata dall'indicazione dell'età e del sesso) in modo da garantire il **completo anonimato** dei risultati delle prove di laboratorio e quindi la riservatezza (privacy) dei dati.

- In una riunione che la direzione delle scuola vorrà organizzare saremo a vostra completa disposizione per informazioni e chiarimenti sull'infezione da CMV e sui metodi per prevenirla

In conseguenza dell'anonimato che garantisce la riservatezza dei dati, non saranno disponibili i risultati per singolo bambino.

Allegato 6.3: adesione allo studio nelle scuole

Il _____ sottoscritto _____ genitore _____ di _____ dichiara di aver compreso finalità e modalità di svolgimento dello studio ‘Saliva & CMV’ proposto dalla sez. di Virologia del Dipartimento di Sanità Pubblica – Microbiologia – Virologia dell’Università degli Studi di Milano e acconsento alla partecipazione al suddetto studio.

A tal fine autorizza la raccolta di un campione di saliva del figlio/a (mediante tampone) che verrà analizzato e conservato presso il lab.1 del suddetto dipartimento. Sono a conoscenza del fatto che il campione verrà trattato in forma anonima nel rispetto della legge 196/03 e che i risultati dello studio verranno forniti esclusivamente in forma aggregata e non per singolo bambino.

Data.....

firma.....

Allegato 6.4: progetto di collaborazione con il LUMC

PROGETTO: “*Rapid genotyping of Cytomegalovirus (CMV) in DSS (Dried Saliva Swab) by multiplex Real Time –PCR*”

Obiettivo della collaborazione: Validazione e messa a punto di una Real Time per la genotipizzazione di CMV su tamponi salivari secchi (DSS).

Background

La saliva raccolta con tamponi di nylon e in assenza di terreno di trasporto (Dried Saliva Swab, DSS) è un ottimo strumento da utilizzare sia per un potenziale screening neonatale dell’infezione congenita da CMV o per condurre studi epidemiologici sulla circolazione virale in età infantile, sia per velocizzare la normale routine di laboratorio per la diagnosi di infezione, non solo da CMV, ma anche da altri virus. Questo è conseguenza del fatto che

la saliva è notoriamente un campione ad alta carica virale e che la modalità di raccolta a secco ne facilita sia il prelievo che la conservazione e il trasporto al laboratorio.

Dal 2008, dopo una prima fase di prove di validazione su campioni artificiali (mock saliva), abbiamo messo a punto la metodica per la ricerca in nested PCR del CMV-DNA su campioni clinici di saliva esaminando i DSS raccolti in bambini con infezione da CMV accertata o sospettata. Il metodo sviluppato ha mostrato nell'individuare soggetti con infezione da CMV sensibilità e specificità prossime al 100% rispetto alle prove svolte, sempre in nested-PCR, sia su urina sia sul tampone salivare classico in terreno di trasporto (Classical Saliva Swab, CSS). Successivamente tutti i campioni sono stati testati in Real Time con un kit commerciale (Argene). I risultati ottenuti si allineano perfettamente con quelli ottenuti in nested PCR, sia su mock-saliva sia sui campioni clinici.

In considerazione dei risultati sopra riassunti e delle informazioni relative al ruolo che diversi genotipi di CMV possano avere nel determinare il rischio e la gravità dell'infezione soprattutto congenita ci si propone di indagare se i DSS possano essere uno strumento utilizzabile anche sulla piattaforma Real Time descritta per la genotipizzazione sui campioni di sangue secco (DBS) nell'articolo di De Vries et al. dell'università di Leiden: "Rapid genotyping of cytomegalovirus in dried blood spots by multiplex real time PCR assays targeting the envelope glycoprotein gB and gH genes" (1). A questo scopo si è avviata una ricognizione sulla possibilità di allargare a questo argomento la collaborazione già esistente con il gruppo olandese.

Protocollo di collaborazione:

Analisi sulla piattaforma messa a punto dal gruppo della Dott.ssa de Vries di DSS (circa 70) già esaminati in nested e in Real time PCR presso UNIMI e sui quali nel nostro laboratorio sarà già stata effettuata la genotipizzazione per il gene gB mediante RFLP (2).

- Durata collaborazione: 30 giorni nel periodo compreso tra 1 agosto al 16 ottobre.
- Il nostro laboratorio nella persona della Dott.ssa Bubba, si preoccuperà di far pervenire in Olanda i DSS da testare e di collaborare allo svolgimento delle prove necessarie
- Nel laboratorio della Dott.ssa de Vries verranno eseguiti i test per la convalida della metodica e di analisi dei campioni clinici forniti
- La Valutazione dei risultati verrà svolta coinvolgendo i responsabili dei laboratori interessati.

Risultati attesi:

- Verifica della compatibilità tra DSS e la piattaforma multiplex Real Time-PCR del gruppo olandese
- Confronto dei risultati delle genotipizzazioni ottenute con RFLP e multiplex Real Time-PCR
- La conoscenza della storia clinica dei bambini selezionati per questo studio preliminare in associazione con i risultati ottenuti potrebbe evidenziare se l'infezione con un particolare ceppo o una carica virale molto elevata possano essere fattori di prognosi negativa, come indicato da alcuni autori (2,3).

Possibili sviluppi della ricerca:

- Confronto dei risultati della genotipizzazione su campioni diversi dato che per la maggior parte della casistica presa in esame è disponibile anche il campione di sangue secco neonatale (DBS) la cui analisi ha permesso di discriminare tra infezione da CMV congenita o post-natale.
- Studio allargato, da applicare contemporaneamente presso le Università di Milano e di Leiden per lo studio dell'infezione congenita su campioni clinici di neonati

random raccolti entro le prime 2 settimane di vita e per studi di popolazione in asili nido o scuole materne, dove la frequenza d'infezione è molto alta. Ciò permetterebbe di confermare e rafforzare i dati ottenuti con lo studio preliminare e di valutare se esiste una differenza nella circolazione dei genotipi tra i due paesi.

Bibliografia:

1. J. JC de Vries, E. Wessels, A. MH Korver, A. A van der Eijk, L.G Rusman, A. CM Kroes, and A. CTM Vossen: "*Rapid genotyping of cytomegalovirus in dried blood spots by multiplex real time PCR assays targeting the envelope glycoprotein gB and gH genes*" J Clin Microbiol 2012; 50:2320–7
2. M. Barbi, S. Binda, S. Caroppo, V. Primache, P. Didò, P. Guidotti, C. Corbetta b, D.Melotti : "*CMV gB genotypes and outcome of vertical transmission: study on dried blood spots of congenitally infected babies*"; J Clin Virology 2001; 21: 75–79
3. S. Walter, C. Atkinson, M. Sharland, P. Rice, E. Raglan, V. C Emery, P. D. Griffiths2 "*Congenital cytomegalovirus: association between dried blood spot viral load and hearing loss*"; Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2008; 93(4):F280-5

6 BIBLIOGRAFIA

1. **Barbi M., Binda S., et al:** *L'infezione congenita da cytomegalovirus è un problema di sanità pubblica?* Ben Notiziario ISS, 2008; 21: 7-8.
2. **Dollard S, Grosse S, Ross D:** *New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection.* Rev Med Virol, **17**(5):355-363.
3. **Stagno S., Pass R.F., et al:** *Congenital and Perinatal Cytomegalovirus Infections.* Seminars in Perinatology 1983; 7; 31-42;
4. **Barbi M., Binda S., et al:** *Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: a powerful tool for diagnosing congenital infection.* J Clin Virol 2000; 21: 75-79.
5. **Forman M, Valsamakis A, Arav-Boger R.:** *Dried urine spots for detection and quantification of cytomegalovirus in newborns.* Diagn Microbiol Infect Dis. 2012 Aug;73(4):326-9
6. **Barbi M., Mackay, Binda, van Loon:** *External quality assessment of cytomegalovirus DNA detection in dried blood spots.* BMC Microbiol, 2008; 8;8:2.
7. **Yamamoto A.Y., Mussi-Pinhata M.M., Marin L.J., et al.:** *Is saliva as reliable as urine for detection of congenital CMV infection?* J Clin Virol 2006, 36:228-230.
8. **Boppana S, Rivera L, Fowler K, al:** *Viral Load in Infancy Predicts Outcome in Children with Congenital CMV Infection.* In: *41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*: 2001; Chicago, Ill. - U.S.A.; 2001.
9. **Gentry G.A., Lowe M., Alford G., Nevins R.:** *Sequence analysis of herpesviral enzymes suggest an ancient origin for human sexual behavior.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988;85:2658-61;

10. **Hanshaw J.B.:** *Cytomegalovirus*. In: Gard S., Hallauer C., Meyer KF., Eds
Virology monographs. New York: Springer-Verlag 1968;2-23;
11. **Lipschutz B.:** *Untersuchungen uber die atilogie der krankhuten der
herpesgruppe*. Arch. Derm. Syph. (Berl) 1921: 136:428-82;
12. **Weller Th., Hanshaw J.B., Scott D.E.:** *Serological differenciation of viruses
responsible for Cytomegalic inclusion disease*. Virology, 1960; 12: 130-132;
13. **Stagno S., Pass R.F., Dworsky M.E., Alford C.A. jr:** *Maternal Cytomegalovirus
infection and perinatal transmission*. Clen obsdet. Jenecol.1982; 25: 563-76;
14. **Roizman B., Carmichael L.E., et al.:** *Herpesviridae. Definition, provisional
nomenclature and taxonomy*. Intervirology 1981; 16: 201-17;
15. **Severi B., Landini M.P., Govoni E.:** *Human Cytomegalovirus morphogenesis:
an ultrastructural study of late cytoplasmic phases*. Arch. Virol. 1988; 98: 51-64;
16. **Vonka V., Benyesh-Melnick M.:** *Thermoinactivation of Cytomegalovirus*. J.
Bacteriol 1966; 91: 221-26;
17. **Irmiere A., Giswon W:** *Isolation and characterization of a noninfectus virion-like
particle released from cells infected with human strains of Cytomegalovirus*.
Virology 1983; 130: 118-33;
18. **Stinski M.F., Mocarski E.S., Thomsen D.R.:** *DNA of human Cytomegalovirus:
size, heterogeneity and defectiveness resulting from serial undiluted passage*. J.
Virol. 1979; 31: 231-39;
19. **Mocarski E.S., Liu A.C.; Spaete R.R.:** *Structure and variability of the a
sequence in the genome of genome of human Cytomegalovirus (Towne strain)*.
J.Gen. VIrol. 1987; 68: 2223-30;

20. **Hayward G.S., Ambinder R., Ciuffo D., Hayward S.D., La Femina R.L.:** *Structural organization of human Herpesvirus DNA molecules.* J. Invest. Dermatol. 1984; 61: 119-34;
21. **Spaete R.R., Mocarski E.S.:** *The a sequence of the Cytomegalovirus genome function as a cleavage/packaging signal for Herpes Simplex virusdefective genome.* J. Virology 1985; 56: 135-43;
22. **Kemble G.W., Mocarski E.S.:** *A host cell protein binds to a highly conserved sequence element (pac-2)within the Cytomegalovirus a sequence.* J. Virol. 1989; 63: 4715-28;
23. **Chee M.S., Bankier A.T., Beck S. et al:** *Analysis of the protein-coding contents of the sequence of human Cytomegalovirus strain AD 169.* Curr. Top: microbial. Immunol: 1990; 154: 125-70;
24. **Mocarski E.S. jr:** *Cytomegalovirus biology and replication.* In: The Human Herpesvirus 1993; 173-210;
25. **Jeang K.T., Hayward G.S.:** *A Cytomegalovirus DNA sequence containg tracs of tandemly repated CA dinucleotides Hybridizes to higly repetitive dispersed elements in mammalian cell genomes.* Mol. Cell. Biol.: 1983; 3: 1389-402;
26. **Tolkoff N. E., Rubin R.H., Keller E.E., et al.:** *Cytomegalovirus infection in dyalisis patiants and personnel.* An. Intern. Med. 1978; 89:625-8
27. **Lang D.J.:** *The epidemiology of Cytomegalovirus infections.* In: Krugman S. Grhonn A.A.,eds. Infection of fetus and newborn infant. New York: Alan R. Liss, 1975: 35-45

28. **Spector S.A. et al.:** *Identification of multiple Cytomegalovirus strain in homosexual men with acquired immunodeficiency syndrome.* J. Infect. Dis., 1984; 150:953-6
29. **Reynolds DW et al:** *Maternal Cytomegalovirus excretion and perinatal infection.* N. Engl. J. Med., 1973; 289: 1-5
30. **Dworsky ME et al.:** *Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy.* Pediatrics, 1983; 72: 295-9
31. **Waten M.W., et al.:** *Temporal regulation of human Cytomegalovirus transcription at immediate early times after infection.* J. Virol., 1981; 38:446-59
32. **Landini M.P., Michelson S.:** *Human Cytomegalovirus proteins.* Prog. Med. Virol., 1988 Vol 35 pp 152-185;
33. **HO M.:** *Pathology of Cytomegalovirus infection. In Cytomegalovirus, biology and infection: current topics in infectious diseases.* Greenough WB III, Merigan Tc ED. New York: Plenum Press 1982: 105-118;
34. **Griffiths P.D, Groundy J.E.:** *Molecular biology and immunology of Cytomegalovirus.* Biochem. J. 1987; 241: 31-34;
35. **Sissons J.G.P.:** *The immunology of Cytomegalovirus infection.* J. R. Coll. Physician Lond 1986; 20: 40-44;
36. **Landini M. P.:** *Antibody response to Cytomegalovirus proteins.* Reviews in Medical Virology 1992; 2: 63-72;
37. **Bonfils P., François M., et al:** *La surdit  en periode neonatale: les bases du depistage.* Arch. Pediatr. 1995; 2: 685-91;
38. **Sculerati N.:** *Hearing impairment among children.* Laryngoscope 2000; 110: 787-798

39. **Fowler K.B., Pass R.F., et al:** *Newborn hearing screening: will children with hearing loss caused by congenital Cytomegalovirus infection be missed?* Journal of Pediatrics 1999; 135: 60-64;
40. **Stagno S., Pass R.F., et al:** *Maternal Cytomegalovirus infection and perinatal transmission.* Clin. Obster. Gybecol. 1982;25: 563-576;
41. **Stagno S., Pass R.F., et al:** *Congenital Cytomegalovirus infection: the relative importance of primary and recurrent maternal infection.* N. Eng. J. Med 1982; 306: 945-949;
42. **Stagno S., Pass R.F., et al:** *Congenital and Perinatal Cytomegalovirus Infections.* Seminars in Perinatology 1983; 7: 31-42;
43. Huang E.S et al.).
44. **Ortona L., Tumbarello M., Cauda R.,:** *L'infezione da Cytomegalovirus umano.* Aggiornamento del Medico 1990; 14-10;
45. **Whitley R.J.:** *Ganciclovir: Have we established clinica value in the treatment of Cytomegalovirus infections?* Annals of International Medicine 1988 Vol. 108;
- a. **Versteeg J.:** *Acyclovir as a chemotherapeutic agent in herpes infections.* Ned. T. Geneesk 1980; 124/49: 2109-2110;
- b. **Musiani M., Beltrani F., Zerbini M., Landini M.P., Nicolini C., La Placa M., :** *Cytomegalovirus induced early conformational changes of cell chromatin revealed by automated image analysis.* Microbiologica 4, 1981, 101-113;
46. **Bowden R.A.:** *Cytomegalovirus infections in transplate patients: methods of prevention of primary Cytomegalovirus infection.* Transplantation Proceedings 1991; 23: 136-138;

47. **Elek S.D., Stern H.:** *Development of vaccine against mental retardation caused by Cytomegalovirus infection in utero* . Lancet 1974; 1: 1-5;
48. **Neff B.J., Weibel R.E., et al:** *Clinical and laboratory studies of live Cytomegalovirus vaccine AD169*. Proc Soc Exp Biol Med 1979; 160: 32-37;
49. **Plotkin S.A., Farquhar ., et al:** *Candidate Cytomegalovirus strain for human vaccination*. Infection & Immunity 1975; 12: 521-527;
50. **Plotkin S.A., Farquhar ., et al:** *Clinical trials of immunization with Towne 125 strain of human Cytomegalovirus*. J Inf. Dis. 1976; 134: 470-475;
51. **Marshall G.S., Plotkin S.A.:** *Progress toward developing a Cytomegalovirus vaccine*. Infect. Dis. Clinics N. Am. 1994; 4: 283-298;
52. **Quinnan G.V. Jr, Delery et al:** *Comparative virulence and immunogenicity of the Towne strain and a non attenuated strain of Cytomegalovirus*. Ann. Intern. Med. 1984; 101: 478-483;
53. **Adler S.P., Hempfling S.H., et al:** *Safety and immunogenicity of the Towne strain Cytomegalovirus vaccine*. Ped. Infect. Dis. J. 1998; 17: 200-206;
54. **Plotkin S.A., Starr S.E., et al:** *Effect of Towne live virus vaccine on Cytomegalovirus disease after renal transplant. A controlled trial*. Ann. Intern. Med. 1991; 114: 525-531;
55. **Chou S.W.:** *Acquisition of donor strains of Cytomegalovirus by renal-transplant recipients*. N. Engl. J. Med. 1986; 314: 1418-1423;

56. **Wang J.B., Adler S.P., et al:** *Mucosal antibodies to human Cytomegalovirus glycoprotein B occur following both natural infection and immunization with human Cytomegalovirus vaccines.* J. Infect. Dis. 1996; 174: 387-392;
57. **Plotkin S.A., Starr S.E., et al:** *Protective effects of Towne Cytomegalovirus vaccine against low-passage cytomegalovirus administered as a challenge.* J. Infect. Dis. 1989; 159: 860-865;
58. **Mocarski E.S. Jr., Kemble G.w.:** *Recombinant Cytomegalovirus for study of replication and pathogenesis.* Intervirology 1996; 39: 320-333;
59. **Quadri I. Navarro D., et al:** *Assembly of conformation-dependent neutralizing domains on glycoprotein B of human Cytomegalovirus.* J. Gen. Virol. 1992; 73: 2913-2921;
60. **Britt W.J., Mach M.:** *Human Cytomegalovirus glycoproteins.* Intervirology 1996; 39: 401-412;
61. **Pass R., Duliege A.M.:** *Antibody response to a fourth dose of CMV gB vaccine in healthy adults.* Poster 157-6th International Cytomegalovirus Workshop, 1997;
62. **Mitchell D., Holmes S.J., et al:** *Immunogenicity of a recombinant human cytomegalovirus gB vaccine in toddlers.* Poster 50-6th International Cytomegalovirus Workshop, 1997;
63. **Bennink J.R., Yewdell J.W., et al:** *Recombinant vaccinia virus primes and stimulates influenza haemagglutinin-specific cytotoxic T cells.* Nature 1984; 311: 578-579;

64. **Taylor J., Meignier B., et al:** *Biological and immunogenic properties of a canarypox-rabies recombinant, ALVAC-RG (Vcp65) in non-avian species.* Vaccine 1995; 13: 539-549;
65. **Adler S.P., Gonczol E., et al:** *A canarypox vector expressing Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B primes for antibody responses to a live attenuated CMV vaccine (Towne).* J. Infect. Dis. 1999; 180: 843-846;
66. **McLaughlin-Taylor E., Pande H., et al:** *Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes.* J. Med. Virol. 1994; 43: 103-110;
67. **Wills M.R., Carmichael A.J., et al:** *The human cytotoxic t-lymphocyte (CTL) response to Cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL.* J. Virol. 1996; 70: 7569-7577;
68. **Burian K., Endresz V., et al:** *Prevalence of the IE1-exon4-specific CTL in naturally seropositive healthy individuals.* Poster 7th International Cytomegalovirus Workshop, 1999;
69. **Gyulai Z., Pincus S., et al:** *Canarypox-CMV-pp65 recombinant immunization of seronegative subjects elicits pp65 specific CTL precursors with a frequency comparable to pp65 specific frequency of naturally seropositive individuals.* Poster-7th International Cytomegalovirus Workshop, 1999;

70. **Revello M.G., Percivalle E., et al:** *Detection of human Cytomegalovirus immediate early antigen in leukocytes as a marker of viremia in immunocompromised patients.* J. Med. Virol. 1989; 29: 88-93;
71. **Dankner W.A.M., Mc Cutchan J.A., et al:** *Localization of human Cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes by hybridization.* J. of Infectious Diseases 1990; 161: 31-36;
72. **Griffiths P.D., Stagno S., et al:** *Infections with Cytomegalovirus during pregnancy: Specific IgM antibodies as a marker of recent primary infection.* J. Infect. Dis. 1982; 145: 647-653;
73. **Barbi M., Binda S., Caroppo S.:** *Diagnosis of congenital CMV infection via dried blood spots.* Reviews of Medical Virology 2006; 16:385-392;
74. **Wakefield AJ, Fox JD, Sawyerr AM et al,** *Detection of herpesvirus DNA in the large intestine of patients with ulcerative colitis and Chron's disease using the nested polymerase chain reaction,* J Med Virol 1992; **38:** 183-190;
75. **Schlesinger Y, Halle D, Eidelman AI et al,** *Urine polymerase chain reaction as a screening tool for the detection of congenital cytomegalovirus infection,* Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2003; **88:** F371-F374.
76. **James B., Hanshaw M.D. :** *Cytomegalovirus: Biology and Infection.* Am J Dis Child. 1983;137(5):508
77. **De Vries J.J.C., Wessels E., et al.:** *Rapid genotyping of Cytomegalovirus in Dried Blood Spots by Multiplex Real –Time PCR assay targeting the envelope glycoprotein gB and gH genes.* J. Clin. Microbiol. 2012; 50: 232-7

78. **Barbi M., Binda S., et al.:** *CMV gB genotypes and outcome of vertical transmission: study on dried blood spots of congenitally infected babies.* J. of clin. Virol. 2001; 21:75-9
79. **Ross S. A., Novak Z., et al.:** *Mixed infection and strain diversity in congenital Cytomegalovirus infection.* JID 2011; 204: 1003-7
80. **Pass R.:** *Dried blood spots and universal newborn screening for congenital Cytomegalovirus infection.* CID 2011; 52: 582-4