

Citomegalovirus

M.P. Landini

Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Bologna

I Citomegalovirus (CMV) sono agenti virali ubiquitari che infettano le più svariate specie animali, incluso l'uomo. Questi virus sono altamente specie-specifici e da ciò deriva che il virus umano non è infettante per altre specie animali e, analogamente, i CMV animali non infettano l'uomo.

CMV è, probabilmente, tra i virus presenti da più tempo nella specie umana, come dimostra il fatto che tracce dell'infezione da CMV sono state rinvenute in popolazioni isolate nelle quali ancora non erano presenti infezioni da parte di altri virus molto diffusi, quali il virus del morbillo o i virus influenzali.

La prima descrizione di un'infezione da CMV risale al 1904, anno in cui il patologo tedesco Ribbert descrisse di avere visto larghe cellule simil-protozoarie in sezioni di rene di un neonato deceduto pochi giorni dopo la nascita. Nello stesso anno Jesionek e Kiolemenoglou descrissero cellule ingrandite e con evidenti inclusioni intranucleari in rene, fegato e polmone in un feto morto prematuramente e specularono sulla possibile origine protozoaria di tali cellule. Tyzeer nel 1906 sottolineò la somiglianza di queste cellule con i reperti istologici osservati nei materiali biotici provenienti da casi di varicella. Solo nel 1941, tuttavia, Lipschutz, sulla base di tali analogie, suggerì un'eziologia virale per queste lesioni. Il termine citomegalia, invece, fu proposto da Goodpasture e Talbot nel 1921 per sottolineare il caratteristico reperto istopatologico.

La dimostrazione di un'eziologia virale fu inequivocabilmente ottenuta parecchi anni dopo (era il 1956) tramite l'isolamento del virus in colture di cellule in vitro da tre gruppi di ricerca contemporaneamente: il gruppo della Smith, di Rowe e di Weller.

La stessa Smith nel 1962 fu il primo ricercatore che osservò CMV al microscopio elettronico e ne definì

la morfologia. Da allora in avanti lo sviluppo delle conoscenze sulla biologia di CMV e sul suo ruolo nella patologia ha subito un rapido e affascinante progresso, giungendo all'attuale fase di dissezione dei meccanismi di regolazione dell'espressione genomica virale.

Inoltre, mentre si può ragionevolmente presumere che la diffusione dell'infezione nella popolazione sia sempre stata costantemente elevata, il numero e la varietà di infezioni sintomatologicamente evidenti (malattia citomegalica) sono notevolmente aumentate nel corso delle ultime tre decadi, in quanto sono aumentati i soggetti esposti ai principali fattori di rischio che sono l'immatrità nel neonato, i trapianti di organi, i tumori maligni, la splenectomia, le trasfusioni di sangue, le infezioni da HIV e l'età avanzata.

Caratteristiche biologiche

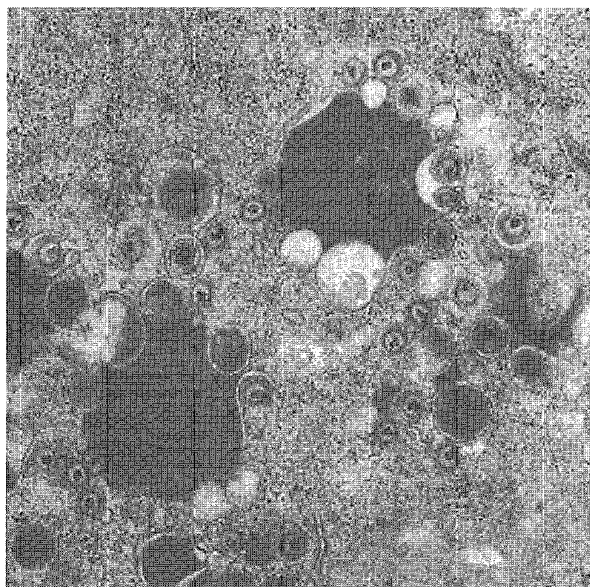
Il Citomegalovirus umano è un virus appartenente alla famiglia *Herpesviridae*, sottofamiglia *Betaherpesvirinae* (Roitzman, 1992). Questi virus sono caratterizzati dall'aver uno spettro d'ospite ristretto, dal replicarsi con alta efficienza solo in cellule fibroblastoidi della specie ospite naturale in vivo, dall'aver un ciclo replicativo assai lento e infine dal produrre inclusioni sia a livello nucleare che citoplasmatico.

I virioni maturi hanno forma rotondeggiante con un diametro medio di circa 200 nm; presentano un involucro pericapsidico (envelope) acquisito da vacuoli derivati dall'apparato di Golgi nel citoplasma della cellula ospite o dalla membrana plasmatica della cellula stessa (Severi et al., 1988) e un nucleocapside icosaedrico di circa 100 nm di diame-

tro, formato da 162 capsomeri e avvolto da uno strato elettrondenso di materiale fibroso e granulare di natura proteica (matrice o tegumento). I virioni, a causa dello spessore variabile del tegumento, sono pleomorfi e il loro diametro può variare dai 150 ai 250 nm. Oltre ai virioni, vi sono altri due tipi di particelle aberranti chiamate "dense bodies" (DB) e "non infectious enveloped particles" (NIEP). I DB, che sono rivestiti da un envelope uguale a quello dei virioni, sono caratterizzati dall'aver, di solito, dimensioni maggiori degli altri due tipi di particelle e dal fatto di non contenere né il genoma del virus, né la struttura capsidica interna, ma solo alcune delle proteine virali unitamente ad alcune proteine cellulari. Anche i NIEP non contengono il genoma virale ma, a differenza dei DB, contengono un capsido e un tegumento con tutte le proteine virioniche oltre a una proteina addizionale (di peso molecolare 38 kD). In pratica, entrambe queste particelle difettive mancano dell'acido nucleico, ma sono rivestite di un envelope uguale a quello del virus e quindi sono in grado di penetrare nella cellula ospite, pur non dando origine a un ciclo replicativo completo. Un'immagine ottenuta mediante microscopia elettronica a trasmissione di particelle virali complete e incomplete nel citoplasma di una cellula infetta è mostrata in figura 1.

Il virus entra nella cellula ospite attraverso un primo debole legame mediato da una glicoproteina dell'envelope e l'eparan-solfato. A questo primo contatto ne segue uno più specifico tra un'altra gli-

Figura 1.



coproteina dell'envelope (gB) e il vero e proprio recettore cellulare di peso 30 kD. Successivamente inizia il processo di fusione favorito da glicoproteina H (gH) e da altre glicoproteine dell'envelope.

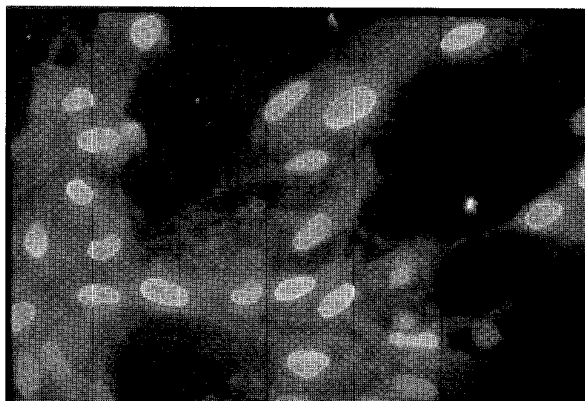
Nell'infezione produttiva, l'espressione sequenziale del genoma virale è regolata temporalmente. I geni virali sono classificati in tre categorie: precocissimi, trascritti nelle prime tre ore dopo la penetrazione del virus, precoci dalle tre ore fino all'inizio della replicazione del genoma virale e tardivi dopo la replicazione genomica (Stinski, 1990). A ciascuna fase trascrittiva corrisponde la comparsa di antigeni particolari e di altrettanto particolari alterazioni morfologiche.

Il primo gruppo di antigeni che compare nella cellula dopo l'inizio del ciclo replicativo di CMV è quello definito precocissimo, che ha localizzazione nucleare ed è evidenziabile con l'immunofluorescenza indiretta già dopo 20 min dall'inizio dell'infezione. I componenti principali di questo complesso antigenico sono due proteine di peso molecolare 76 e 82 kD.

Un'immagine di antigeni precocissimi ottenuta mediante immunofluorescenza indiretta è mostrata nella figura 2.

Successivamente (6-12 h dall'inizio dell'infezione), tra quelli che sono definiti eventi precoci perché sono sempre precedenti, ma conducono alla neosintesi del DNA virale, è compresa la sintesi degli antigeni precoci a localizzazione nucleare, citoplasmatica e di membrana. Questa fase è anche caratterizzata dalla comparsa di un cambio di conformazione della cellula infetta, che consiste principalmente in un arrotondamento e parziale distacco dal fondo del contenitore in cui le cellule sono state coltivate. Tra i componenti degli antigeni precoci vi sono la DNA polimerasi virale e una proteina a essa accessoria

Figura 2.



che ha caratteristiche DNA-binding e peso molecolare 52 kD.

Dopo la replicazione del DNA virale, altri antigeni vengono espressi nelle cellule infettate e la maggior parte di essi rappresentano le proteine strutturali della particella virale matura. Questi antigeni sono chiamati tardivi e anch'essi come i precoci hanno una localizzazione nucleare, citoplasmatica e di membrana. I principali polipeptidi strutturali che compongono gli antigeni tardivi sono una proteina di peso 150 kD, un'altra presente in grande abbondanza di peso 65 kD e una capsidica di peso 28 kD. La fase tardiva della replicazione di CMV è caratterizzata, dal punto di vista morfologico, da un nuovo cambio, che consiste principalmente nel fatto che la cellula infettata torna ad appiattirsi adesa al fondo del contenitore e assume una morfologia quasi epitelioide.

Oltre agli antigeni appena descritti, CMV induce la comparsa di un recettore per il frammento Fc delle IgG (tutte le sottoclassi) e di un recettore per il C3 del complemento.

Nella tabella 1 sono elencati i principali polipeptidi strutturali e non strutturali di CMV, unitamente alle regioni del genoma che li codificano e alla reattività immunitaria umorale che sono in grado di evocare durante l'infezione naturale.

Patogenesi dell'infezione

CMV è un virus patogeno, ma presenta una patogenicità limitata, come dimostrato dal fatto che la maggior parte delle infezioni decorre in modo inapparente. La patogenicità di questo virus è in buona parte dovuta alla capacità di interagire con le difese immunologiche dell'ospite (Gehrz et al., 1991).

CMV resta tenacemente associato alle cellule sia in vivo che in vitro. Il diffondersi dell'infezione all'interno dei tessuti avviene principalmente mediante il passaggio da una cellula a quella adiacente. È per questo che la neutralizzazione da parte degli anticorpi specifici contro le glicoproteine superficiali spesso fallisce. Per di più, la fase viremica è piuttosto corta. Inoltre l'immunità alla reinfezione è incompleta, probabilmente perché la maggior parte delle reinfezioni è dovuta a stipti diversi. È probabile anche che il legame non specifico delle IgG al recettore per il frammento indotto dal virus nelle cellule infettate protegga queste cellule dalla lisi immune a opera di anticorpi e complemento e

Tabella 1. Elenco delle maggiori proteine virali non strutturali e strutturali, delle regioni genomiche che le codificano e della risposta immune nell'ospite.

Proteine		Localizzazione genomica**	Risposta anticorpale naturale		
IMW*	Denominazione		IgG	IgM	NT***
STRUTTURALI					
Envelope					
gp86/145	gCIII/gH	UL75	+	+	++
gp6-52			+	-	+
gp58/116	gCI/gB	UL55	+++	-	+++
gp47-52	gCII	US6	+	?	?
gp45	IMP	UL100	?	?	?
gp48	EGP	UL4	+	?	+
Tegumento					
p200-216		UL48	+	?	?
pp150	BPP	UL32	++++	++	-
pp71	UMP	UL82	+	-	-
pp85	LMP	UL83	+++	++	-
Capside					
p155	MCP	UL86	+	+	-
pp38	AP	UL80	+	+++	-
pp34		UL46	?	?	-
pp28		UL99	+++	-	-
p12			+	-	-
Collocazione sconosciuta					
pp96		UL56	+	?	?
NON STRUTTURALI					
Precocissime					
pp68-72	MIE	UL123	++	+	-
Precoci					
pp140,58	DNA pol	UL54	+	-	?
pp 130	MDBP	UL57	?	?	-
p80, p85, p90		?	+	?	-
p76	ICP22	US22	+	?	?
Tardive					
pp82	ICP36	UL44	+++	++++	-

* In condizioni denaturanti.

** Secondo l'analisi delle sequenze del genoma di Chee (et. al., 1990).

*** Induzione di anticorpi neutralizzanti l'infettività virale.

IMP = integrate membrane protein; EGP = early glycoprotein; BPP = basic phosphoprotein; UMP = upper matrix protein; LMP = lower matrix protein; MCP = major capsid protein; AP = assembly protein; MIE = major immediate early; MDBP = major DNA binding protein; DNA pol = DNA polymerase; ICP = infected cell polypeptide.

dalle cellule T citotossiche (Gehrz et al., 1991). Recenti osservazioni suggerirebbero che le cellule infettate da CMV possano, attraverso il recettore per il frammento Fc, trattenere batteri rivestiti da anticorpi o altri immunocomplessi portando a ulteriori fatti infiammatori nei tessuti infettati.

Oltre a sfuggire alla neutralizzazione, l'infezione è di per sé immunosoppressiva. Non deprime la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente, ma quasi tutte le altre risposte cellulo-mediate. Il virus deprime infatti la risposta immunoproliferativa dei T ai mitogeni e a vari antigeni, infetta i monociti e sopprime la presentazione dell'antigene e il rilascio di interleukina 1. È stato inoltre documentato che CMV può anche sopprimere le funzioni (anche la produzione di interferone γ) dei linfociti a grossi granuli, le cellule principali responsabili dell'attività NK.

Infine, l'infezione induce autoimmunità. Infatti anomalie immunologiche che indicano reattività

autoimmune sono presenti in più del 50% dei casi di mononucleosi da CMV. Frequentemente si osserva: elevati titoli di agglutinine da freddo, crioglobulinemia, elevato livello di fattore reumatoide, ipergammaglobulinemia policlonale, test di Coombs positivo e anticorpi antinucleari.

Trasmissione ed evoluzione dell'infezione nell'ospite

L'infezione da CMV può essere esogena o endogena. Nel primo caso il virus infetta il soggetto ricevente dall'esterno attraverso un contatto diretto (tutte le secrezioni di un individuo in fase acuta di infezione contengono il virus) o attraverso l'organo trapiantato (nel caso dei trapiantati) oppure attraverso i leucociti del sangue trasfuso. È importante ricordare che la trasmissione sessuale è la modalità di trasmissione più frequente nell'età adulta. Il virus può essere trasmesso a un individuo che non ha mai contratto l'infezione (infezione esogena primaria, facilmente causa di manifestazione patologica), ma anche a un individuo che è già immune (infezione esogena secondaria, raramente sintomatica). In entrambi i casi, a seconda della fonte di infezione, il primo sito di replicazione di CMV può essere l'epitelio al sito di ingresso (oro-faringeo, genitale etc.), le cellule dell'organo trapiantato o i monociti del sangue trasfuso differenziati in macrofagi. Nel caso di infezione endogena il virus, che si trova presente in forma latente in un tessuto (sono molti i tessuti in cui CMV instaura una infezione latente) o nei monociti, può andare incontro ad una ripresa della fase replicativa (infezione endogena da riattivazione dell'infezione latente). In entrambi i casi (infezione esogena o endogena), dalle cellule di prima replicazione, il virus diffonde alle cellule contigue e ciò si traduce in una diffusione localizzata dell'infezione all'interno di un organo/tessuto. Molto spesso nei soggetti non immunodepressi il virus resta confinato all'interno di un organo/tessuto. Frequentemente, invece, nei soggetti con deficit immunitari, il virus può, diffondendo per contiguità, arrivare fino all'endotelio ed iniziare a replicarsi nelle cellule endoteliali, completamente permissive. Queste cellule, dopo infezione, producono citochine e fattori chemoattrattivi che aumentano la capacità di adesione dei monociti (MNL) e dei leucociti polimorfonucleati (PMNL). Nei primi il virus penetra e instaura una fase di latenza, dai PMNL il virus viene fagocita-

tato, la proteina virale pp65 viene trasferita nei nuclei dove permane a lungo, mentre il resto della particella viene lentamente sottoposto a degradazione. I PMNL possono trasmettere il virus infettante per almeno due giorni dopo aver fagocitato le particelle virali, i monociti qualora si differenzino in macrofagi tissutali diventano completamente permissivi per la replicazione di CMV e possono trasmettere l'infezione alle cellule del tessuto, infine le cellule endoteliali citomegaliche verranno trattenute a livello capillare e diffonderanno l'infezione all'endotelio adiacente. In questo modo e grazie a queste cellule (oltre che al virus libero) l'infezione, da una fase di diffusione localizzata, può passare ad una fase di disseminazione (ematica) generalizzata. Risulta evidente che nell'organismo infettato si ha un "traffico" di particelle virali da e per l'epitelio e da e per l'endotelio. La replicazione sottoepiteliale e sottoendoteliale implica una diffusione locale del virus, l'eventuale passaggio a livello extraepiteliale (endoluminale) ed extraendoteliale (ematico) prelude alla disseminazione della infezione (figura 2a).

Epidemiologia e cenni clinici

Nel corso dell'esistenza, dal 40 all'80% degli individui nei paesi industrializzati e la quasi totalità degli individui nei paesi in via di sviluppo, vanno incontro a infezione da CMV (tabella 2), che si traduce in una infezione latente con persistenza del genoma virale in alcune sedi cellulari (linfociti, epitelio dei tubuli renali e delle ghiandole salivari (Ho, 1990). Gli esseri umani sono l'unico reservoir per CMV umano e la trasmissione avviene per contatto interumano diretto o indiretto. A causa della fragilità del virus ai fattori ambientali, un contatto stretto è richiesto per il propagarsi orizzontale dell'infezione. Le fonti di infezione includono: secrezioni orofaringee, urina, secrezioni cervicali e vaginali, sperma, latte materno, lacrime, feci e sangue. La propagazione dell'infezione è favorita dalla durata molto prolungata dell'eliminazione del virus e dal fatto che la maggior parte delle infezioni decorre asintomaticamente. L'infezione è endemica piuttosto che epidemica e non presenta picchi né stagionali, né legati a particolari professioni. Fattori socioeconomici e igienici sono invece correlati strettamente e in modo inversamente proporzionale alla diffusione dell'infezione, sia verticale che orizzontale.

Figura 2a.

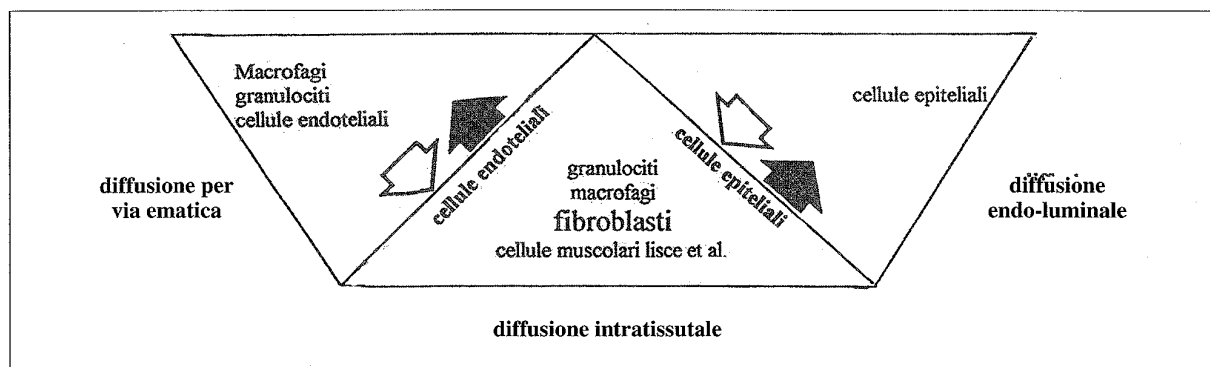


Tabella 2. Prevalenza di anticorpi anticitomegalici nella popolazione adulta di vari paesi.

Località	Percentuale di sieropositività per CMV
Lione (Francia)	40
Friburgo (Germania)	42
S. Gallo (Svizzera)	45
Albany, NY (USA)	45
Melbourne (Australia)	54
Bologna (Italia)	72
Houston, Tx (USA)	79
Roma (Italia)	80
Buenos Aires (Argentina)	81
Bari (Italia)	92
Hong Kong (Cina)	94
Sendai (Giappone)	96
Rabat (Marocco)	98
Manila (Filippine)	100
Calcutta (India)	100
Entebbe (Uganda)	100

Oltre al contatto diretto con le secrezioni infette, la trasmissione dell'infezione può avvenire mediante trasfusione di sangue e rapporti sessuali. Prove dirette della trasmissione per via eterosessuale si sono ottenute dall'analisi mediante enzimi di restrizione del genoma degli isolati da partner sessuali. Nella quasi totalità dei casi i ceppi virali isolati da partner sessuali coincidono.

L'infezione da CMV nei soggetti con buone funzioni immunitarie decorre, di norma, in modo asintomatico. Le infezioni sintomatiche sono appannaggio di determinate categorie di soggetti nei quali il sistema immunitario per motivi fisiologici (neonati o anziani) o per motivi farmacologici (nei soggetti sottoposti a trattamenti immunosoppressivi perchè riceventi in trapianti d'organo) o infine per motivi patologici (come nel caso di infezione da HIV) non risponde adeguatamente agli stimoli antigenici.

Una percentuale oscillante tra lo 0,2 e il 2,2% della

popolazione è infettata in utero in seguito a passaggio diaplacentare del virus. Il 10-15% di questi neonati presenta sintomatologia evidente alla nascita, mentre un altro 10% circa presenterà segni tardivi, quali ritardo mentale e sordità (Alford and Britt, 1990; Alford et al., 1990). È da far rilevare che oltre il 50% di bambini con infezione congenita da CMV sviluppa deficit uditivi di varia entità e che la gravità del deficit è correlata al momento della trasmissione della infezione dalla madre al feto. Deficit severi sono riconducibili esclusivamente a infezioni trasmesse durante i primi quattro mesi di gravidanza. Durante l'infanzia la trasmissione dell'infezione è estremamente alta negli asili e nelle scuole elementari. Le infezioni di norma decorrono in modo inapparente o con una leggera sintomatologia a carico dell'apparato respiratorio. Nei giovani e negli adulti sani i casi di infezione sintomatica da CMV sono rari e si riferiscono tutti a casi di mononucleosi (Cassai et al., 1983).

Tutti i riceventi di trapianto d'organo sono a potenziale rischio di acquisizione di una grave infezione da CMV (Glenn et al., 1981; Wreighitt, 1989). Il rischio maggiore vi è quando un ricevente di trapianto è sieronegativo prima del trapianto e riceve l'organo da un individuo sieropositivo. La quantità di gravi infezioni da CMV dopo il trapianto dipende da una varietà di altri fattori, primo fra tutti il tipo di terapia immunosoppressiva utilizzata. In linea di massima, comunque, l'infezione primaria da CMV dopo trapianto avviene nel 60-90% dei riceventi sieronegativi e in circa la metà di questi soggetti l'infezione è sintomatica. Anche i soggetti sieropositivi possono contrarre l'infezione, ma questa è di norma asintomatica.

Uno dei gruppi di soggetti più a rischio di gravi malattie da CMV è rappresentato dai pazienti affetti

da AIDS (Drew, 1988; Quinnan et al., 1984) e ormai è generalmente riconosciuto che l'elevata incidenza di infezioni sistemiche da CMV in questi pazienti rappresenta uno dei problemi di maggiore impegno clinico e terapeutico nel settore delle infezioni opportunistiche associate all'AIDS. In genere si ritiene che una quantità di linfociti CD4+ inferiore a $50/\text{mm}^3$ rappresenti un fattore di rischio estremamente grave per questi pazienti, in cui l'infezione da CMV si può presentare sotto un'estrema varietà di quadri clinici (dalla colite all'encefalite, dall'esofagite a complicate forme di neuropatia).

Diagnosi di laboratorio

Ricerca di IgG specifiche per determinare un'avvenuta infezione

Le metodiche più frequentemente impiegate a questo scopo sono la fissazione del complemento, l'emoagglutinazione passiva, l'agglutinazione al lattice, il test di sieroneutralizzazione, la radioimmunoprecipitazione, il saggio radioimmunologico, la controimmunolettroforesi, il saggio immunoenzimatico, l'immunofluorescenza, l'immunoperossidasi e l'immunoblotting (Doerr, 1990; Landini, 1993).

L'agglutinazione al lattice è diventata una metodica importante di screening del sangue e di donatori d'organo. Il saggio garantisce il risultato in pochi minuti ed è ragionevolmente accurato, nonostante un 5% di errori (soprattutto falsi negativi) e un certo grado di soggettività nella lettura del risultato.

Non c'è dubbio comunque che la metodica più impiegata per la determinazione della sieropositività è rappresentata dal saggio immunoenzimatico comunemente noto con l'acronimo ELISA e più di 50 diversi kit sono disponibili sul mercato internazionale. L'accordo tra i risultati ottenuti con differenti kit commerciali è soddisfacente, anche se però questi test presentano una rilevante cross-reattività con altri virus erpetici e con il virus dell'epatite B, probabilmente per la presenza di antigeni crociati e di componenti cellulari negli involucri esterni virali acquisiti a spese delle membrane citoplasmatiche cellulari. Questi problemi verranno risolti con la messa a punto e la produzione di una terza generazione di kit ELISA che utilizzino antigeni virali ricombinanti o peptidi sintetici rappresentanti i maggiori epitopi antigenici delle proteine del virus.

Ricerca del virus o di suoi componenti direttamente nel materiale patologico per dimostrare un'infezione in corso

Visualizzazione del virus

Solamente nei casi in cui il virus venga eliminato a titolo molto elevato (come nei bambini infettati congenitamente, nei quali spesso si raggiungono titoli di 10 milioni di particelle/ml di urina) si ha la possibilità di vedere il virus direttamente mediante microscopia elettronica dopo concentrazione delle particelle virali e "colorazione negativa" delle medesime. Specie nei bambini, il rischio di errore con altri Herpesvirus dall'identica morfologia non è molto elevato in quanto, in questi casi, CMV è l'unico virus erpetico che si può trovare in abbondanza nell'urina e la morfologia dei virus erpetici è identificabile facilmente. La microscopia elettronica può essere utile anche per la visualizzazione del virus in materiali autoptici o bioptici, dove però il problema identificativo differenziale tra i diversi virus erpetici esiste e può essere risolto mediante immunoelettromicroscopia utilizzando anticorpi monoclonali o sieri policlonali monospecifici per alcuni antigeni del virus.

Visualizzazione delle inclusioni virali

Cellule con inclusioni possono essere ritrovate negli strisci di sedimenti di vari liquidi organici (urine, latte, secrezioni tracheali e cervicali) così come in preparati per impronta ottenuti da biopsie o pezzi autoptici. Le cellule citomegaliche possono essere facilmente evidenziate per la loro grandezza (10-40 μm) scarso citoplasma, largo nucleo con una o più evidenti inclusioni separate dalla cromatina marginata da un alone chiaro. In contrasto con l'isolamento virale, la sensibilità delle tecniche citologiche è scarsa. Per esempio nei neonati infettati congenitamente, cellule con inclusioni citomegaliche sono escrete solo intermittenemente (in circa il 50% dei casi). Inoltre, il ritrovamento di tali cellule in un sedimento urinario non è di per sè patognomonico di infezione da CMV, perchè altre infezioni virali possono indurre inclusioni intranucleari morfologicamente simili che possono rendere impossibile l'identificazione dell'agente infettante. La sensibilità e la specificità aumentano se la ricerca delle cellule citomegaliche nei sedimenti o nei liquidi organici e in materiali autoptici e bioptici viene completata mediante una

reazione immunologica eseguita con anticorpi monoclonali specifici contro antigeni virali (ricerca diretta di antigeni virali) o mediante reazione di ibridizzazione per la ricerca del DNA virale eseguita con sonde idonee (ricerca del genoma virale).

Ricerca del virus infettante

La dimostrazione della presenza del virus infettante può essere ottenuta mediante l'isolamento tradizionale del virus dopo inoculo dei materiali patologici in colture di fibroblasti umani. I campioni di urina possono essere direttamente inoculati nel terreno di coltura di fibroblasti embrionali umani in coltura (WI-38, MRC5, Flow 2002, MA184, ecc.) e lasciati per almeno 1 giorno; alternativamente possono essere diluiti 1:2 in terreno fresco e lasciati a contatto con i fibroblasti per un paio d'ore prima della rimozione dell'inoculo e la sostituzione del terreno. In un tempo strettamente dipendente dal titolo virale presente nel materiale (da 2 giorni fino a 5-6 settimane), il virus induce la comparsa del caratteristico effetto citopatico, caratterizzato da lesioni focali che sono costituite dalle tipiche cellule citomegaliche. Da parecchi anni ormai a questo tipo di indagine viene preferita la ricerca anticipata della presenza del virus nelle cellule inoculate con il materiale patologico. La metodica rapida più impiegata è la cosiddetta metodica "shell vial", che consiste nell'inoculare il materiale patologico su un monostrato di fibroblasti cresciuti su un vetrino, nel sottoporlo a una successiva centrifugazione (la centrifugazione aumenta la permeabilità cellulare) e, dopo un'incubazione a 37 °C per 12-20 h, nel ricercare, mediante immunofluorescenza, la presenza dell'antigene virale precocissimo (p72) con un idoneo anticorpo monoclonale (si identifica quindi la presenza del virus prima della comparsa dell'effetto citopatico). La centrifugazione dell'inoculo (700 g per 30-45 min), il trattamento delle cellule con svariate sostanze chimiche (DMSO, desametasone) o con shock termico fanno aumentare la sensibilità delle colture all'infezione.

Nonostante l'indubbia utilità dello "shell vial assay", questa metodica rapida è stata dimostrata molto meno sensibile rispetto all'isolamento tradizionale per ritrovare il virus nel buffy coat del sangue periferico al fine di diagnosticare una fase viremica. Probabilmente sono necessari più di 2 giorni perchè il virus presente nei leucociti sia in grado di infettare i fibroblasti.

Anche in altri casi l'isolamento del virus può risultare impossibile o estremamente complesso, ad esempio, nei casi di materiali patologici che mostrano la presenza di una forte contaminazione microbica (ad es., contaminazione da *Candida* spp. nella saliva) oppure per la coinfezione con virus che hanno una replicazione più veloce (ad es., il virus dell'Herpes simplex), o anche per la citotossicità del materiale inoculato (ad es., urina di pazienti in trattamento citostatico) o, infine, per l'inattivazione del virus da inadeguata conservazione dei materiali. Nonostante, quindi, l'isolamento del virus in coltura rappresenti la procedura diagnostica definitiva contro la quale le nuove metodiche devono essere confrontate, in vari casi si rendono necessarie metodiche alternative che non necessitano della vitalità del virus per il suo ritrovamento, quali la ricerca diretta degli antigeni o del genoma virale.

Ricerca diretta di antigeni virali

La ricerca diretta degli antigeni virali nei materiali patologici mediante l'utilizzo di specifici anticorpi monoclonali è stato sperimentato con successo in alcuni materiali patologici. A questo proposito è da tenere in considerazione che in tutti i casi in cui siano le particelle virali libere a essere ricercate, gli anticorpi monoclonali migliori sono quelli che riconoscono il componente più abbondante delle particelle virali (pp65); nei casi invece in cui siano le cellule infettate a essere ricercate (lavaggio broncoalveolare, biopsie ecc.), gli anticorpi migliori sono quelli che reagiscono con i principali antigeni precoci (p72 e p52).

Le metodiche di ricerca di antigeni specifici sono state applicate con successo anche alla ricerca di CMV nell'urina dopo concentrazione delle particelle virali mediante ultracentrifugazione, filtrazione o precipitazione, nelle cellule del lavaggio broncoalveolare (BAL) e in biopsie. In questi casi sono necessarie estrema cautela ed esperienza nell'interpretazione dei risultati e una certa conoscenza della composizione cellulare del campione.

Di particolare interesse clinico si è recentemente dimostrato il ritrovamento di p65 direttamente nei granulociti polimorfonucleati del sangue periferico per l'identificazione di una fase viremica.

Ricerca del genoma virale.

Molta attenzione ha ricevuto nell'ultimo decennio la

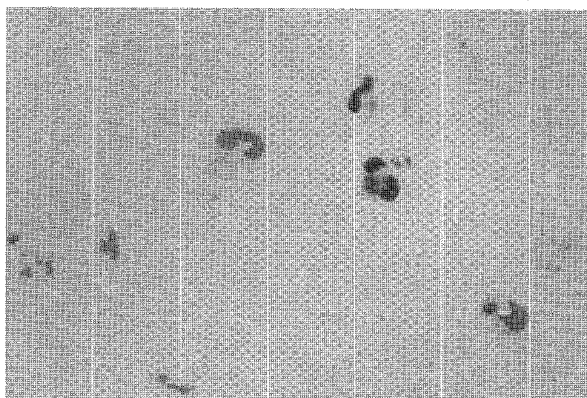
ricerca del genoma del virus tramite saggi di ibridizzazione con idonee sonde e con o senza amplificazione preliminare delle sequenze da ricercare (Chou, 1991). L'utilizzo di questa tecnica per la ricerca della presenza di CMV è stata facilitata dalla disponibilità di una grande varietà di sequenze di CMV clonate. D'altra parte la sequenza del genoma di CMV è pubblicata quasi completamente e ciò rende possibile (almeno teoricamente) la costruzione di qualunque sonda per qualunque sequenza nota (Chee et al., 1990). Alcune regioni del genoma di CMV contengono sequenze omologhe a sequenze cellulari o al genoma di altri virus erpetici (soprattutto Herpes virus umano 6), ed è quindi bene vengano escluse per evitare segnali non corretti.

Per l'identificazione di CMV nei materiali patologici a fini diagnostici il dot blot e l'ibridizzazione in situ sono le metodiche più frequentemente utilizzate. Per poter evidenziare l'avvenuta ibridizzazione, le sonde vengono marcate con un composto che le rende rintracciabili (tracciante). La marcatura con radioisotopi (^{32}P , ^{125}I , ^{35}S , ^3H) rende la sonda estremamente sensibile, ma presenta vari inconvenienti legati all'uso di sostanze radioattive. Nel corso degli ultimi anni sono stati sperimentati con successo vari traccianti non radioattivi; il più utilizzato è sicuramente la biotina, la cui presenza viene evidenziata mediante complesso con avidina o streptavidina, a loro volta legate a un enzima (di solito la perossidasi, tenendo sempre presente la possibilità che nel campione da esaminare vi siano cellule con perossidasi endogena). Varie sonde biotinilate per CMV sono state messe a punto e alcune sono in commercio da vari anni; è mostrato un esempio di reazione positiva nella figura 3.

Un'alternativa più recente alle sonde biotinilate è venuta dalla possibilità di marcare gli acidi nucleici con la digossigenina. Il ritrovamento della digossigenina viene poi garantito da una reazione immunoenzimatica che si basa sul legame con anticorpi antidigossigenina, marcati enzimaticamente (ad es., con la fosfatasi alcalina). Una sonda consistente nei frammenti Xba I D e I marcati con digossigenina si è dimostrata in grado, qualora la reazione fosse amplificata mediante chemiluminescenza, di ritrovare quantità pari a 10 femptogrammi di DNA virale che di norma si rintracciano solo con sonde a sviluppo radioisotopico.

Qualunque sia il metodo di rilevazione è da sottolineare un certo elevato numero di campioni (specialmente "buffy coat") in cui si sospetta un risultato

Figura 3.



falso positivo (tutte le altre metodiche danno infatti risultato negativo).

Sull'utilizzo dell'ibridizzazione con dot blot, molti Centri hanno ormai un'esperienza pluriennale e l'accordo generale è che questo metodo è meno sensibile dell'isolamento del virus in coltura. Tentativi di spingere i limiti di sensibilità generalmente risultano in alcuni falsi positivi.

L'ibridizzazione in situ è una metodica importante che può essere di aiuto nell'identificazione di un tessuto o di un organo infettato dal virus. È più sensibile del riconoscimento delle inclusioni mediante esame istologico, può essere condotta anche su sezioni incluse in paraffina e fissate in formaldeide a differenza della ricerca diretta degli antigeni ed è più convincente, ai fini della diagnosi di malattia, che il ritrovamento del virus in materiali quali l'urina o la saliva, che possono rappresentare siti di eliminazione asintomatica del virus. Bisogna comunque sottolineare il fatto che quando si ritrova il virus in parenchima di rilievo, può essere troppo tardi per il trattamento terapeutico del paziente. Inoltre la correlazione tra un risultato positivo ottenuto con l'ibridizzazione in situ e la malattia clinicamente manifesta non è completa.

Segnali positivi sono stati infine ottenuti in organi non coinvolti clinicamente e istopatologicamente nella malattia citomegalica. Quindi l'entusiasmo iniziale e la successiva delusione hanno fatto sì che oggi si possa guardare con senso realistico all'utilizzo (limitato) delle sonde nella diagnosi di infezioni da CMV (Chou, 1990; 1991).

Una svolta decisiva nel settore delle sonde molecolari si è avuta con la messa a punto di un metodo che amplifica automaticamente il frammento genico da ricercare attraverso la PCR (Polymerase Chain

Reaction). La scelta dei primer è uno dei momenti più critici e per l'applicazione clinica si richiede l'uso di sequenze altamente conservate.

È per questo motivo che la maggior parte dei primer utilizzati per ritrovare il genoma di CMV sono oligonucleotidi della regione di trascrizione precocissima del genoma (frammento XbaI E, lontano dalla zona di omologia con il DNA cellulare) o della regione che codifica per il maggior antigene strutturale pp150 (Eco RI c, Y). Questi primers sono stati utilmente impiegati per la ricerca del genoma di CMV sia nell'urina che in altri materiali patologici, quali il sangue e il liquido di lavaggio broncoalveolare. Un confronto con l'isolamento del virus in coltura dimostra come la PCR presenti una sensibilità e una specificità del 100%. I vantaggi rispetto all'isolamento sono i seguenti: la PCR richiede una quantità di materiale molto ridotta (ad es., 1 µl di urina), tutta la procedura può essere fatta in 24 ore, non viene manipolato virus infettante e non si devono far crescere colture di cellule in vitro che, nonostante siano ormai alla portata della maggior parte dei laboratori, richiedono ancora un notevole impegno di tempo e costi elevati. Inoltre, i materiali patologici possono essere conservati congelati per svariati mesi/anni anche con ripetuti cicli di congelamento e scongelamento (che inattivano completamente l'infettività del virus). Recentemente la PCR è stata applicata con successo anche alla dimostrazione della presenza del virus nel sangue (DNAemia, si veda in seguito). Così come per l'urina, però i campioni che risultano negativi all'isolamento e positivi alla PCR devono essere studiati molto attentamente, in quanto questi risultati possono essere dovuti alla maggiore sensibilità della PCR o essere dei falsi positivi. L'imminente disponibilità di kit commerciali che utilizzano sistemi di rilevazione non radioattivi dovrebbe allargare l'uso della PCR e la sua valutazione clinica.

Determinazione di una fase viremica come indice di severità dell'infezione

La fase sintomatica dell'infezione da CMV coincide con la fase viremica, mentre l'eliminazione del virus con la saliva dura più a lungo, ancora più duratura è la fase di viruria. Quindi, come in altre infezioni virali, anche la viremia da CMV può rappresentare un segno di infezione sistemica e di probabile presente o futuro coinvolgimento d'organo dell'infezione.

Tradizionalmente, il modo per evidenziare una fase viremica consiste nell'isolamento del virus dal "buffy coat". Questa metodica, oltre che dei tempi necessari di cui abbiamo già detto (la metodica rapida dello "shell vial" non è consigliabile nel caso del "buffy coat"), soffre anche del fatto che i leucociti, a causa della loro tossicità sui monostrati cellulari in coltura, non consentono un agevole isolamento del virus.

Come metodica sostitutiva si può ricercare la presenza del DNA virale (DNAemia) con idonee sonde con o senza amplificazione. La PCR nel siero si è dimostrata particolarmente utile per individuare la presenza di CMV in neonati infettati congenitamente, nei quali l'isolamento non era stato possibile e le IgM non erano state prodotte.

Nel 1988 il gruppo di Thè ha dimostrato come si possano anche ricercare antigeni di CMV nei leucociti del sangue periferico, arricchiti in granulociti polimorfonucleati (antigenemia) (Thè et al., 1990; 1991). Tra i leucociti, quelli che risultano positivi per pp65 sono i PMNL. Tuttavia, anche se più raramente (<10%) i monociti-macrofagi possono risultare positivi. È stato calcolato che durante la fase viremica nei soggetti immunodepressi i PMNL positivi per p65 variano da 1:100 a 1:1000.000 a seconda del livello di infezione.

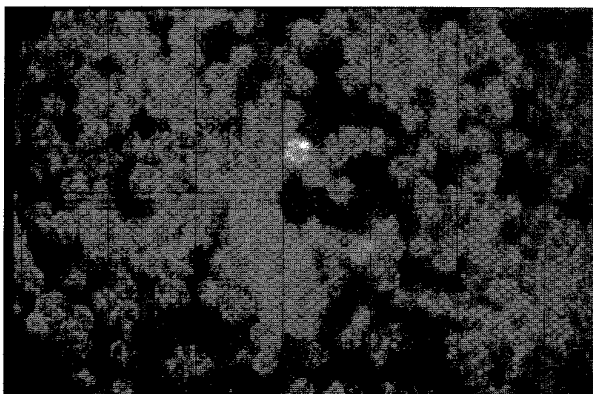
Per la ricerca del virus nel sangue in ordine di sensibilità la metodica più sensibile risulta essere la ricerca del DNA virale mediante PCR, seguita dall'ibridizzazione con sonde molecolari tradizionali, quindi dalla ricerca degli antigeni nei PMN mediante utilizzo di anticorpi monoclonali e, per ultimo, l'isolamento del virus in coltura.

In studi longitudinali su pazienti trapiantati si è stabilito che il massimo livello di antigenemia lo si ritrova, di norma, tra i 20 e i 29 giorni dopo il trapianto ed è anticipato nelle infezioni primarie (media 23 giorni) e posticipato nelle secondarie (media 31 giorni). Le IgM si ritrovano 10 e le IgG 15 giorni dopo la positività all'antigenemia. L'antigenemia compare appena prima dell'inizio della sintomatologia e rimane rintracciabile per alcune settimane dopo la guarigione. Il carico di antigene (valutato come il numero di PMN positivi) corrisponde alla gravità della sintomatologia, è inversamente proporzionale alla risposta immune e le manifestazioni cliniche sono coincidenti con il massimo carico antigenico nei PMN. Il carico antigenico è maggiore nelle infezioni primarie che nelle secondarie. In genere si ritiene che una sintomatologia severa

sia correlata alla presenza di più di 100 PMNL positivi/ 2×10^5 cellule osservate. Inoltre nel periodo di massimo coinvolgimento viscerale sono presenti in circolo anche grandi cellule positive agli antigeni del virus e che rappresentano cellule endoteliali. Il numero di cellule endoteliali positive può quindi rappresentare un altro indice di gravità dell'infezione ed è un segnale che suggerisce un'ispezione endoscopica di accertamento. In genere si è visto che la forte riduzione dell'antigenemia coincide con la massima presenza di IgM specifiche. Un'immagine di PMNL con antigeni di CMV (pp65) è mostrata nella figura 4.

Una serie di ulteriori considerazioni meritano attenzione. La presenza di CMV nel sangue ritrovata mediante PCR (DNAemia) non correla necessariamente con la malattia; infatti, molti pazienti presentano periodi prolungati di positività alla DNAemia, in assenza di sintomi clinici. Si ritiene, infatti, che una quantità estremamente modesta di virus nel sangue, quale quella che la PCR è in grado di ritrovare, possa essere eliminata fisiologicamente, almeno in presenza di una buona risposta immune specifica. Da qui la necessità di seguire i pazienti anche dal punto di vista sierologico, come suggerito da Thè. La ricerca del DNA virale effettuata mediante PCR non è da utilizzare per il monitoraggio routinario dei soggetti a rischio, ma il metodo migliore a questo fine sembra essere la ricerca degli antigeni nei PMNL effettuata mediante il test dell'antigenemia coadiuvata, dal punto di vista sierologico, da un test ELISA. D'altra parte, essendo la PCR più sensibile delle altre tecniche, fornisce un'indicazione più accurata della totale scomparsa di CMV dal sangue e si suppone che la presenza del DNA virale nei granulociti possa essere un'indicazione di rischio di

Figura 4.



infezione, la terapia anticitomegalica dovrebbe essere proseguita fino alla negativizzazione del sangue accertata mediante PCR. Si veda anche il paragrafo "monitoraggio dell'infezione da CMV nei pazienti trapiantati".

È da ricordare infine la dissociazione tra viremia (negativa) e antigenemia (positiva) che si può osservare all'inizio della terapia con DHPG o Foscarnet, imputabile al blocco della replicazione del DNA e alla persistenza degli antigeni; e anche la dissociazione tra viremia (negativa) e antigenemia e DNAemia (positiva) che si può riscontrare all'inizio e alla fine dell'infezione attiva e che è da attribuire a una differente sensibilità delle metodiche utilizzate per la ricerca del virus.

Ricerca di particolari segni immunitari per dimostrare un'infezione in corso o pregressa da poco

Oltre alle prove dirette della presenza del virus, si possono ricercare segni indiretti della sua presenza, dimostrando, mediante tecniche sierologiche, la presenza di anticorpi specifici. È chiaro comunque che il loro ritrovamento non attesta inequivocabilmente un'infezione in corso, ma nella maggior parte dei casi è solo sinonimo di immunità e quindi di infezione pregressa. È per tale motivo che le indagini sierologiche, almeno tutte le volte che esse rappresentino l'unico strumento utilizzabile ai fini diagnostici, vengono di norma condotte con particolari accorgimenti (ricerca di anticorpi della classe IgM, ricerca di aumento di titolo anticorpale in due prelievi adeguatamente distanziati, ecc.) intesi a dimostrare una particolare classe di anticorpi o un anticorpo con una determinata specificità oppure un "movimento" anticorpale in atto. Qualora comunque i campioni di siero non siano stati raccolti ad appropriati intervalli di tempo e nelle fasi opportune dell'infezione, l'incremento del titolo sfugge all'investigatore; conseguentemente si preferisce ricorrere a tecniche che richiedono l'esame di un solo campione di sangue. A questo fine si possono ricercare le IgM specifiche. A questo proposito si deve anche ricordare come poco affidabili siano i kit ELISA attualmente disponibili in commercio per la ricerca delle IgM nei confronti di CMV. Infatti l'accordo tra un kit e l'altro non supera il 60%.

La presenza di IgM va poi correttamente valutata a seconda del soggetto in cui viene ritrovata. In una donna in gravidanza una positività certa per le IgM è sinonimo di infezione attiva da CMV in

corso o recente (o di tipo primario o secondario). Ciò non equivale a dare la certezza della presenza del virus in condizioni tali da poter essere trasmesso al feto, nè tantomeno indica che l'infezione virale materna è stata trasmessa. Nel caso, quindi, di una presenza di IgM per CMV in una donna in gravidanza è solamente consigliabile continuare gli accertamenti, in un primo momento sulla donna stessa (esami virologici), quindi (qualora si ritenesse opportuno) sul feto (liquido amniotico e sangue fetale).

La presenza di IgM nel sangue fetale (prelevato mediante cordocentesi) indica passaggio della infezione dalla madre infetta al feto. Ulteriori accertamenti non sono indispensabili.

La presenza di IgM in un neonato nei primi 7-10 giorni di vita è indice certo di infezione congenita. Anche in questo caso non sono necessari ulteriori accertamenti. La presenza di IgM nel sangue di un neonato dopo i primi giorni di vita è sinonimo di infezione perinatale o neonatale solo se l'infezione è stata esclusa nel corso della prima settimana di vita. Nei soggetti immunocompetenti la positività certa per le IgM è sinonimo di infezione attiva in corso o recente e anche in questo caso ulteriori accertamenti non sono necessari.

Nei soggetti immunocompromessi (trapiantati) la presenza di IgM è un indice di infezione attiva in corso o recente, ma in questi pazienti è bene continuare gli accertamenti al fine di evidenziare markers indicativi di importanza clinica di infezione (ad esempio la presenza di antigenemia).

Infine non è consigliabile l'approccio sierologico alla diagnosi nei soggetti affetti da AIDS, in quanto, per i noti disequilibri della risposta immune, è molto raro che in questi pazienti vengano prodotte IgM anche nel corso di infezioni attive sintomatologicamente evidenti.

In circa il 75% dei casi l'assenza di IgM per CMV è un indizio sicuro di non infezione citomegalica in corso o recente. Nel 25% dei casi circa, le IgM possono non essere state prodotte da soggetti effettivamente in fase acuta di infezione. Qualora i sospetti clinici o altri motivi lo richiedessero, potrebbe essere opportuno continuare gli accertamenti ricercando il virus o i suoi componenti direttamente nei materiali patologici. In caso di negatività è comunque indicato ripetere il test a una settimana di distanza.

Da ricordar, infine, che anche la presenza di significativi titoli (1:40) di anticorpi contro gli antigeni precoci e precocissimi indotti dal virus nelle cellule

infettate e ritrovati con immunofluorescenza è indice di infezione attiva. Gli anticorpi specifici per questi antigeni sono, infatti, presenti in modo preferenziale nei soggetti con un'infezione in corso (Landini, 1985).

Sono stati anche pubblicati dati che indicavano come la ricerca delle IgA specifiche per CMV possa essere di aiuto nella diagnosi di infezione attiva secondaria da CMV, ma i dati non sono stati confermati e la prudenza indica di astenersi dall'attribuire un qualche significato alla presenza di IgA specifiche per CMV.

Alcune metodiche possibili per identificare un'infezione primaria

L'identificazione di un'infezione primaria da CMV è un problema diagnostico di notevole importanza in quanto le infezioni primarie sono di solito accompagnate da una sintomatologia più severa e quindi meritano una particolare attenzione da parte del clinico. Peraltro il quesito diagnostico è di non facile soluzione. Per diagnosticare un'infezione primaria, oltre alla dimostrazione di uno stadio di infezione acuta che si può ottenere mediante una o più delle metodiche discusse nei paragrafi precedenti, bisogna dimostrare sierologicamente la comparsa di anticorpi in un soggetto precedentemente sieronegativo. In assenza di un campione di sangue ottenuto in una fase precedente l'infezione o contemporanea all'inizio della sintomatologia, è evidente che la comparsa ex novo di anticorpi non può essere evidenziata. Sono state quindi, cercate metodiche alternative basate sull'analisi di un unico campione di sangue e che, anche se non universalmente accettate, possono essere usate vantaggiosamente (Landini, 1993).

I seguenti marker sono stati ritrovati preferenzialmente presenti nelle infezioni primarie:

- a) IgM citolitiche specifiche per le cellule infettate da CMV (si ritrovano con il test del rilascio di ^{51}Cr da cellule incubate con i sieri dopo incubazione con il radioisotopo).
- b) IgM che reagiscono con la membrana di fibroblasti non infetti (si ritrovano con immunofluorescenza utilizzando vetrini di fibroblasti non infetti).
- c) Risposta immune oligoclonale (si identifica con immunoblotting utilizzando blott con le proteine virali).
- d) IgM contro l'antigene non strutturale di peso molecolare 52 kD (si ritrovano con immunoblotting utilizzando l'antigene p52 ricombinante).

e) IgE specifiche per CMV (si ritrovano mediante ELISA).

f) Anticorpi a bassa avidità (si ritrovano con ELISA in cui i sieri vengono incubati con l'antigene in presenza di idonee quantità di urea).

È chiaro che poichè tutte queste soluzioni non sono ancora state sperimentate in un numero sufficientemente alto di casi, in pazienti con diverse patologie e dimostrate essere valide da più di un laboratorio, sarebbe consigliabile che almeno due di questi test dessero la stessa indicazione prima di poter definire con sufficiente sicurezza un'infezione primaria.

Criteria per determinare il passaggio della infezione dalla madre al feto

Qualora venga accertata un'infezione attiva da CMV in una donna in gravidanza e a maggior ragione quando l'infezione attiva è primaria, l'infezione attiva è databile nei primi quattro mesi della gravidanza, si documenta un'eliminazione di virus a livello della cervice uterina (l'eliminazione urinaria non ha rapporto con l'incidenza di trasmissione), è consigliabile continuare gli accertamenti diagnostici sul prodotto del concepimento in modo da determinare l'eventuale avvenuta trasmissione della infezione (Stagno et al., 1985). È ormai generalmente accettato che la diagnosi di infezione da CMV in gravidanza debba essere posta solo ed esclusivamente se il laboratorio è poi in grado di procedere verso la diagnosi prenatale. Il modo più idoneo per accertare il passaggio del virus al feto è attraverso la ricerca del virus o suoi componenti nel liquido amniotico (prelevato mediante amniocentesi) e nel sangue del feto (prelevato mediante cordocentesi). In questi materiali l'isolamento del virus e la PCR per la ricerca del genoma di CMV rappresentano l'approccio metodologico di scelta. Nel sangue fetale possono essere anche ricercate le IgM virus-specifiche che sono prodotte in circa il 75% dei casi di infezione congenita.

Criteria per identificare una infezione congenita

Anche per diagnosticare un'infezione congenita in un neonato, si può ricorrere alla dimostrazione diretta del virus o di suoi componenti oppure alla dimostrazione indiretta della sua presenza ricercando segnali di immunità specifica attraverso la sierologia. Per quanto riguarda la dimostrazione diretta del

virus, questo deve avvenire nei primi 10 giorni di vita del neonato e preferibilmente il più presto possibile per differenziarla dall'infezione perinatale, caratterizzata anch'essa da un'eliminazione del virus molto precoce dopo la nascita. Il virus può essere isolato dall'urina e dal tampone faringeo, ma il primo materiale è preferibile in quanto il virus vi viene eliminato in grandi quantità ed è più stabile che nella saliva.

Classicamente la dimostrazione sierologica di infezione intrauterina si ottiene dimostrando il rialzo o il persistere ad alti livelli di anticorpi di classe G in una serie di sieri raccolti sequenzialmente a cavallo del periodo di tempo in cui ci si aspetta lo scomparire dell'immunità materna. Questo approccio non può essere utilmente impiegato per l'infezione da CMV perchè non permette la distinzione tra infezione congenita e perinatale, dato che entrambe le infezioni inducono alti e persistenti livelli di anticorpi nel corso del primo anno di vita. La diagnosi sierologica di infezione congenita da CMV può essere fatta solo dimostrando la presenza di IgM specifiche nel sangue del cordone ombelicale o nel sangue del neonato nei primi giorni di vita. Varie metodiche sono state impiegate a questo fine, ma tutte presentano problemi di sensibilità e specificità. I problemi maggiori sono rappresentati dalla difficoltà nell'identificazione di bassi livelli di IgM fetali in presenza di alti livelli di IgG materne. Il fattore reumatoide spesso complica ulteriormente la diagnosi e deve essere rimosso.

Anche l'accertamento di un'infezione perinatale non è semplice, perchè si basa sulla determinazione di un'infezione attiva nelle prime settimane di vita contemporaneamente all'esclusione di un'infezione congenita, esclusione che è spesso impossibile.

Monitoraggio della infezione da CMV nei pazienti trapiantati

Nella prima fase della infezione che può richiedere una diagnosi di laboratorio e cioè quella della diffusione localizzata in un organo/tessuto, una biopsia mirata (ad esempio al miocardio per i trapiantati di cuore, al fegato per i trapiantati di fegato etc.) e la ricerca del genoma del virus mediante PCR, può essere l'approccio diagnostico di elezione. Non bisogna dimenticare, però, che, se vi è replicazione renale, il virus può ritrovarsi nell'urina e, se la replicazione è polmonare, il virus può essere ritrovato nel BAL e

che, da questi materiali, l'isolamento rapido del virus (ricerca degli antigeni precoci mediante immunofluorescenza 24 ore dopo l'inoculo del materiale nelle colture di cellule *in vitro*) resta la procedura di elezione.

La fase ematica della infezione che prelude o che è contemporanea alla diffusione generalizzata può essere identificata mediante antigenemia, PCR e isolamento rapido del virus in colture di cellule *in vitro*. Come già ricordato, tra queste tre metodiche la sensibilità maggiore è da attribuire alla PCR, seguita dalla antigenemia e, infine, dall'isolamento rapido del virus. Poiché la ricerca del genoma del virus mediante PCR ha scarso valore predittivo di infezione sintomatologicamente apprezzabile, si ritiene che la ricerca della antigenemia sia l'approccio diagnostico più corretto. Eventuali successivi o contemporanei coinvolgimenti di organo possono essere evidenziati mediante prelievo di materiale bioptico e ricerca del genoma mediante PCR. L'ibridizzazione *in situ* condotta mediante idonee sonde e sistemi vari di rilevazione è meno sensibile e più facilmente dà risultati falso-positivi.

Mentre un eventuale ritrovamento del genoma di CMV in una biopsia in un soggetto con positività ematica implica un consiglio al trattamento farmacologico, il solo ritrovamento di una fase antigenemica non necessariamente fa altrettanto. Sono numerosissimi i lavori in letteratura in cui si cerca di stabilire una soglia di "guradìa" per l'antigenemia e i risultati che i diversi autori riportano sono estremamente discordanti ed è bene che ogni paziente venga valutato individualmente nella sua estrema complessità (numero dei leucociti, livello della risposta immune specifica, sintomatologia, cross-match per CMV etc.) e non si ritiene di poter indicare una soglia limite di numero di PMNL positivi per pp65 sopra la quale sia da consigliare il trattamento e sotto la quale sia da consigliare solamente la continuazione del monitoraggio.

La fase di risoluzione della infezione è caratterizzata dalla possibile presenza in circolo del genoma del virus, ritrovabile mediante PCR, per variabili periodi di tempo in assenza di antigenemia e occasionalmente dalla eliminazione urinaria e/o salivare per periodi anche molto lunghi.

La determinazione della risposta immune non appare essere rilevante ai fini di una diagnosi rapida della infezione da CMV in quanto gli anticorpi specifici compaiono o aumentano in modo significativo solo 7-10 giorni dopo la positività ematica ritrovata mediante antigenemia. Vi sono, però, dati già riportati in letteratura così come nostri personali, i quali deporrebbero per una rilevanza della risposta immu-

ne nella valutazione del rischio del paziente di sviluppare una infezione citomegalica severa.

Diagnosi dell'infezione da CMV nei pazienti affetti da AIDS

Nessuna delle metodiche sierologiche tradizionali e nessuna di quelle più recenti e innovative, che sono utilizzabili per l'identificazione di un'infezione attiva in vari gruppi di soggetti anche immunodepressi può essere utilizzata in questi pazienti nei quali, la diagnosi di infezione attiva si deve basare esclusivamente sul ritrovamento diretto del virus o di suoi componenti. Poiché, analogamente ai pazienti trapiantati, il ritrovamento del virus nell'urina o nella saliva spesso rappresenta solamente un'eliminazione asintomatica del virus, fra i vari materiali patologici da sottoporre a indagine quello di elezione per la diagnosi di infezione sistemica in questi pazienti è senza dubbio rappresentato dai leucociti del sangue periferico arricchiti in polimorfonucleati (Gerna, 1991; Salmon, 1990). Da tenere in considerazione è però il fatto che in questi particolari pazienti (così come nei trapiantati di midollo) la correlazione tra numero di PMNL positivi e sintomatologia clinica è meno stretta che nei soggetti trapiantati. Bisogna inoltre considerare che in questi pazienti le infezioni sistemiche di solito precedono la localizzazione d'organo, localizzazione che può essere in gran parte evitata con un'adeguata e tempestiva terapia sulla base dell'indicazione di positività ematica per il virus. Qualora la localizzazione d'organo sia evidente sintomatologicamente, deve essere sottoposto a indagine il materiale bioptico (e non) prelevato dall'organo interessato.

Attribuzione di un quadro patologico a un'infezione attiva da CMV

L'attribuzione di un quadro patologico a un'infezione attiva da CMV è un problema di notevole importanza e di non semplice risoluzione. Per affrontarlo bisogna innanzitutto tenere presente che CMV il più delle volte ha un ruolo commensale più che patogeno e quindi, anche se viene accertata la sua presenza, questo non autorizza di per sé ad attribuire a CMV l'eziologia di un certo quadro patologico. Molti soggetti infatti possono eliminare il virus con l'urina, lo sperma, le secrezioni vaginali, la saliva

anche per anni dopo l'acquisizione dell'infezione e in assenza di qualunque sintomatologia. Spesso, anche se molto meno frequentemente, anche soggetti viremici possono essere asintomatici.

Quindi per attribuire un'eziologia da CMV a un determinato fatto morboso è necessario che l'infezione attiva da CMV sia identificata in assenza di altri agenti patogeni e di altri processi patologici.

È necessario altresì che venga attribuito un giusto valore ai diversi risultati ottenibili mediante le indagini di laboratorio, cioè che venga valutata l'utilità delle varie procedure diagnostiche a seconda del soggetto sotto indagine e al quadro clinico riscontrato.

Nella tabella 3 viene riassunta l'utilità delle diverse procedure diagnostiche a seconda della situazione clinica.

Conservazione dei materiali patologici per la diagnostica di infezione da CMV

Come tutti i virus erpetici, CMV è generalmente sensibile al pH acido, ai solventi dei lipidi e al calore. La sua vita media è di circa 60 min. a 37 °C. È resistente alla tripsina, ma sensibile agli anticoagulanti e alle lectine.

Se si richiede la conservazione di un materiale patologico per provvedere alla ricerca del virus infettante nei giorni successivi quello della raccolta, è bene tenere presente che mentre l'urina si può conservare a 4 °C anche per 2-3 settimane senza perdita di titolo infettante, la saliva invece non può essere conservata più di 1 giorno senza che il virus, eventualmente presente, venga degradato. CMV è inoltre estremamente sensibile al congelamento (soprattutto a temperature superiori a -70 °C) e il titolo virale cala di un logaritmo a ogni ciclo di congelamento e scongelamento. L'eventuale congelamento con il 50% di siero bovino fetale riduce, anche se non annulla, la perdita di titolo virale.

Se il materiale deve essere invece conservato per poterlo sottoporre successivamente alla ricerca diretta del genoma del virus, esso può essere conservato congelato per mesi senza che questo comporti problemi all'atto dell'esecuzione di test.

Inoltre il sangue eparinato per la ricerca dell'antigenemia nei PMN deve essere sottoposto a indagine entro 5-8 h dal prelievo.

I sieri in cui si ricerca la presenza di IgM è bene vengano conservati sterili a 4 °C invece che congelati, in quanto i cicli di congelamento-scongelamento favoriscono la precipitazione delle IgM.

Tabella 3. Utilità delle procedure diagnostiche più comuni e criteri per la diagnosi di infezione attiva da Citomegalovirus in varie situazioni cliniche (*)

Tipo di infezione	URINA		TC	SALIVA	BIOPSIA	colt buffy coat	SANGUE	PCR	PCR	SIERO	
	ME	colt	colt	colt	PCR		Antigenemia PMNL			IgG	IgM
Congenita	+	+++ ¹		+++		+++	+++	++	+	+	+/-
Neo o Perinatale	+/-	+++ ²		+++		+++	-	?	?	+	+/-
Adulto sano	-	++		++		+	++		?	+++ ³	+++ ⁴
Gravida											
(rischio di trasmissione)			+++	-		+++	+++	++	?	++ ³	++ ⁴
Immunosoppressi (TR)											
infezione sistemica	-	-		+		+++	+++	+++ ⁶	++	+	+
infezione d'organo	-	- ⁵		+/-	++++	++	++		?	+	+
Immunodepressi (AIDS)											
infezione sistemica	-	-		++		+++	+++	+++	++	-	-
infezione d'organo	-	-		+/- ⁷	++++	++	++	+++ ⁶	++	-	-

(*) Tanto maggiore è il valore, tanto più grande è l'utilità. Quando viene segnalato +/- significa che sono possibili falsi positivi e negativi.

(¹) L'isolamento deve avvenire entro i primi 10 giorni di vita del neonato.

(²) L'isolamento deve essere negativo alla nascita e positivo dopo.

(³) Qualora si dimostri una sierconversione o particolari segni immunitari.

(⁴) Con i limiti derivanti dalla scarsa affidabilità dei kit per la ricerca delle IgM attualmente in commercio.

(⁵) Con l'eccezione delle infezioni a livello del rene in trapiantati renali.

(⁶) + se la localizzazione è alle vie respiratorie.

(⁷) quantitativa

ME= microscopia elettronica; TC= tampone cervicale; colt= isolamento del virus in coltura; TR= trapiantati;

PMNL= leucociti polimorfonucleati; PCR= reazione polimerasica a catena.

Bibliografia

- Alford CA, Britt WJ. Cytomegalovirus. In: Fields BN, (ed). *Virology*, 2° ed., Raven press, New York, 1990.
- Alford CA, Stagno S, Pass RF, Britt WJ. Congenital and perinatal Cytomegalovirus infections. *Rev. Infectious Dis.*, 12, S745-753, 1990.
- Cassai E, Landini MP, Di Luca D. Patologia da virus dell'Herpes simplex e citomegalovirus nell'età pediatrica. *Prospettive in pediatria*, 51, 173-185, 1983.
- Chee MS, Bankier AT, Beck S, Bohni CM, Brown CM, Cerny R, Hornsell T, Hutchinson III CA, Kouzarides T, Martignetti JA, Preddi E, Satchwell SC, Tomlinson P, Weston KM, Barrell BG. Analysis of the protein content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169). In: McDougall JK, (ed) Springer-Verlag, Berlin, 125-169, 1990.
- Chou S. Newer methods for diagnosis of Cytomegalovirus infection. *Rev. Infectious Dis.*, 12, S727-736, 1990.
- Chou S. Molecular approaches to the diagnosis of CMV infection. In: Landini MP, (ed). *Recent Progress in Cytomegalovirus Research*, Amsterdam: Elsevier, 91-108, 1991.
- Doerr HW, Albert S. New developments in CMV antibody screening. *Biotest Bull.*, 125-130, 1990.
- Drew WL. Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.*, 158, 449-456, 1988.
- Gehrz RC, Liu YNC, Eckhardt J, Klaus A. Relevance of immune responses to pathogenesis of Cytomegalovirus-associated diseases. *Transp. Proc.*, 23,75-84, 1991.
- Gerna G. Monitoraggio virologico delle infezioni sistemiche da citomegalovirus umano nel paziente con AIDS. *Giorn. It. AIDS*, 2, 150-156, 1991.
- Glenn J. Cytomegalovirus infection following renal transplantation. *Rev. Infect Dis.*, 3, 115-1178, 1981.
- Ho M. Epidemiology of Cytomegalovirus infections. *Rev. Infect. Dis.*, 12, S701-710, 1990.
- Landini MP. Antibody response against early antigens in Herpesviridae infections. *Europ. J. Epidemiol.*, 1, 62-66, 1985.
- Landini MP. Antibody response to Cytomegalovirus proteins. *Rev. Med. Virol.*, 2, 63-73, 1992.
- Landini MP. New approaches and perspective in Cytomegalovirus diagnosis. *Progr. Med. Virol.*, 40, 157-170, 1992.
- Quinnan GV, Masur H, Rook AH, Amstrong G, Frederick W, Epstein J, Manischewitz MS, Macher MD, Jackson, Ames J, Smith HA, Parker M, Pearson GR, Parillo J, Mitchell C, Strauss SE. Herpesvirus infections in the acquired immunodeficiency syndrome. *J. Am. Med. Ass.*, 252, 72-77, 1954.
- Roizman B. The family Herpesviridae: an uptodate. *Arch. Virol.*, 123, 425-449, 1992.
- Salmon D, Lacassin F, Harzic M, Leport C, Perronne C, Bricaire F, Brun-Vezinet F, Vilde JL. Predictive value of cytomegalovirus viremia for the occurrence of CMV organ involvement in AIDS. *J. Med. Virol.*, 32, 160-163, 1990.
- Severi B, Landini MP, Govoni E. Human cytomegalovirus morphogenesis: an ultrastructural study of the late cytoplasmic phases. *Arch. Virol.*, 98, 51-64, 1988.
- Stagno S, Pass RF, Reynolds DW, Moore MA, Nahmias AJ, Alford CA. Comparative study of diagnostic procedures for congenital CMV infection. *Pediatrics*, 65, 251-257, 1985.
- Stinski MF. Cytomegalovirus and its replication. In: Fields BN, (ed), *Virology*, 2° ed. New York. Raven Press, 1990.
- Thè TH, Van Der BIJ W, Van Den Berb AP, Van der Giessen M, Wiets J, Sprenger HG, Van Son WJ. Cytomegalovirus antigenemia. *Rev. Infect. Dis.*, 737-744, 1990.
- Thè TH, Van Der Berg AP, Van Son WJ, Tegzess AM, Slooff MJH, Klompmaker IJ, Haagsma EB, Van Der BIJ W, Van Der Giessen M. Recent advances in the early and reliable immunodiagnosis of cytomegalovirus infection in immunocompromised hosts. In: Landini MP, (ed). *Recent Progress in Cytomegalovirus Research*. Amsterdam: Elsevier, 209-220, 1991.
- Wreighitt T. Cytomegalovirus infections in heart and heart-lung transplant recipients. *Antimicrob. Chemother.*, 23, Suppl. E, 49-60, 1989.