

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

MEDICINA MATERNO-INFANTILE E DELL'ETÀ EVOLUTIVA

Ciclo XX

Settore scientifico disciplinare: PEDIATRIA GENERALE E SPECIALITICA

TRASMISSIONE POST-NATALE DEL CITOMEGALOVIRUS

ATTRAVERSO IL LATTE MATERNO AL NEONATO VLBW

Presentata da: **Dott.ssa MARIA GRAZIA CAPRETTI**

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof. GIAN PAOLO SALVIOLI

Chiar.mo Prof. GIACOMO FALDELLA

Esame finale anno 2008

INDICE

ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI.....	pg.:	3
INTRODUZIONE.....	pg.:	4
- EPIDEMIOLOGIA E CARATTERISTICHE GENERALI DEL VIRUS	pg.:	5
- TRASMISSIONE DEL CMV ATTRAVERSO IL LATTE MATERNO NEL NEONATO A TERMINE.....	pg.:	12
- TRASMISSIONE DEL CMV ATTRAVERSO IL LATTE MATERNO NEL NEONATO PRETERMINE.....	pg.:	14
- FATTORI VIRALI E DELL'OSPITE CHE MODULANO LA TRASMISSIONE DEL CMV ATTRAVERSO IL LATTE MATERNO.....	pg.:	22
- INFEZIONE DA CMV ACQUISITA ATTRAVERSO IL LATTE MATERNO: QUALI SEQUELE A DISTANZA?	pg.:	23
- PREVENZIONE DELL'INFEZIONE DA CMV TRASMESSA ATTRAVERSO IL LATTE MATERNO.....	pg.:	25
MATERIALI E METODI.....	pg.:	29
- POPOLAZIONE STUDIATA.....	pg.:	30
- DISEGNO DELLO STUDIO.....	pg.:	31
- METODICHE.....	pg.:	34
RISULTATI.....	pg.:	40
DISCUSSIONE.....	pg.:	53
BIBLIOGRAFIA.....	pg.:	60

ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

CMV	: Citomegalovirus
DNA	: Acido Desossiribonucleico
EG	: Età Gestazionale
ELBW	: Extremely Low Birth Weight (Peso Neonatale <1000 g)
GE	: Genoma
GRC	: Globuli rossi concentrati
IVH	: Emorragia cerebrale
IVIG	: Immunoglobuline umane endovenose
LM	: Latte Materno
nCPAP	: nasal Continuous Positive Airways Pressure
NEC	: Enterocolite Necrotizzante
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PDA	: Pervietà del Dotto di Botallo
PLV	: Leucomalacia Periventricolare
PMNL	: Polimorfonucleati
PN	: Peso Neonatale
RCP	: Proteina C reattiva
ROP	: Retinopatia della prematurità
SGA	: Small for Gestational Age (piccolo per l'EG)
UTIN	: Unità di Terapia Intensiva Neonatale
VLBW	: Very Low Birth Weight (Peso Neonatale < 1500 g)
VM	: Ventilazione meccanica

INTRODUZIONE

EPIDEMIOLOGIA E CARATTERISTICHE GENERALI DEL VIRUS

I Cytomegalovirus (CMV), membri della famiglia degli Herpesvirus, sono agenti ubiquitari che comunemente infettano le più svariate specie animali tra cui l'uomo. Sono virus altamente specie specifici: infatti il virus umano (HCMV) è incapace di infettare altre specie animali. Sono virus molto antichi, come è dimostrato, dalla rilevazione di anticorpi specifici in popolazioni di origini remote e isolate come gli Indiani di Tiryno del Brasile, dove non erano presenti agenti virali molto diffusi, quali il virus dell'influenza e del morbillo. La caratteristica tipica di questi virus è di indurre la formazione di inclusioni citoplasmatiche e nucleari con conseguente ingrossamento della cellula infettata.

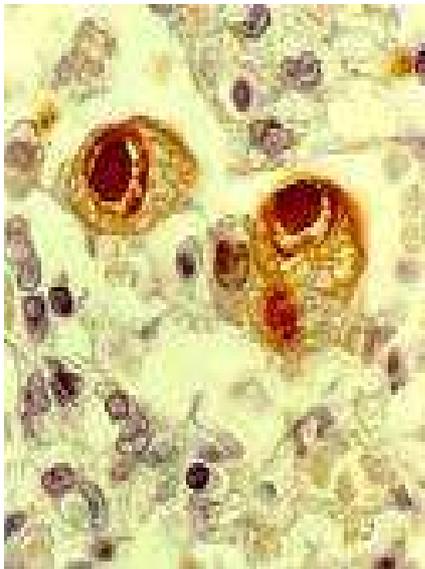
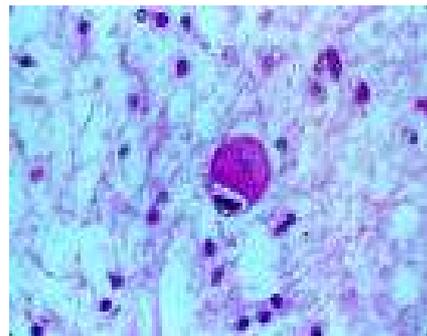


Figura 1 e 2: Inclusioni citoplasmatiche da CMV



Il CMV può penetrare nell'organismo umano per mezzo di secrezioni, liquidi organici oppure attraverso sangue e trapianto d'organo. Nel nucleo delle cellule epiteliali nel primo caso e dei monociti e dei macrofagi nel secondo, il virus inizia a replicarsi sintetizzando nuovi virioni, i quali diffondono all'interno di un tessuto o di un organo invadendo le cellule endoteliali vascolari, sede di attiva replicazione virale. Da qui il virus viene riversato nel torrente circolatorio dove può essere fagocitato dai leucociti polimorfonucleati oppure penetra nei monociti nei quali origina l'infezione latente (ospite immunocompetente). Se l'ospite è immunocompromesso invece, può avere inizio una diffusione sistemica con il coinvolgimento di nuovi organi o tessuti.

Il CMV possiede una bassa patogenicità; tuttavia è in grado di provocare un effetto citopatico nelle cellule infettate. Alla base delle infezioni latenti e persistenti vi è l'instaurarsi di un equilibrio tra il CMV e il sistema immunitario. La perdita di questo equilibrio in soggetti immunodepressi favorisce la replicazione virale a livello del tratto gastro-intestinale, dei polmoni, dei reni, delle ghiandole salivari e surrenali, del fegato e della retina. Le patologie più ricorrenti sono la retinite nei malati di AIDS, la polmonite nei trapiantati di midollo, sordità, ritardo di crescita, microcefalia, calcificazioni cerebrali nei neonati.

Studi sieroepidemiologici, mostrano che nel corso dell'esistenza il 40-100% degli individui nei paesi sviluppati e la quasi totalità di quelli che vivono nei paesi in via di sviluppo vanno incontro ad una infezione da CMV. La sua diffusione risulta endemica piuttosto che epidemica e non presenta picchi stagionali. Fattori socioeconomici ed igienici sono invece correlati strettamente ed in modo inversamente proporzionale alla diffusione della infezione sia orizzontale che verticale. Si ritiene che gli esseri umani siano l'unica riserva per il virus umano e la trasmissione avviene per

contatto interumano diretto o indiretto. Inoltre, a causa della labilità del virus ai vari fattori ambientali, è richiesto un contatto stretto per il propagarsi orizzontale dell'infezione. I veicoli di infezione includono: secrezioni orofaringee, urina, secrezioni cervicali e vaginali, fluidi spermatici, latte materno, lacrime, feci, sangue. I neonati e i bambini acquisiscono il virus durante lo sviluppo intrauterino o durante il parto, o in epoca peri e postnatale.

Studi dimostrano che nei paesi sviluppati, lo 0,2-2,4 % delle infezioni avviene al momento del parto, l'8-60 % durante i primi sei mesi di vita nella maggior parte dei casi attraverso il latte materno. Nei bambini da uno a tre anni l'esposizione al virus avviene in genere in casa o negli asili, dai tre ai dieci anni nelle scuole mentre dopo la pubertà la via di trasmissione orizzontale più comune risulta quella sessuale. In condizione di trapianto la quasi totalità dei pazienti sviluppa una infezione attiva da CMV e in circa la metà dei casi l'infezione citomegalica ha ripercussioni cliniche di varia entità che possono andare dalla febbre a un quadro clinico simil-settico, a una polmonite interstiziale.

Il virus ha un diametro di 200 nm ed è il più grande tra gli Herpesvirus (figura 3).

All'interno della particella virale si trova il core che è costituito da una matrice proteica fibrinosa associata al DNA lineare a doppia catena del genoma virale.

Il core è circoscritto dal capsido icosaedrico che a sua volta è circondato dall'involucro virale composto da un doppio strato lipidico e da proteine di membrana incluse specifiche del virus (tra cui gB, gH e gN) che contribuiscono all'assorbimento ed alla penetrazione del virus nelle cellule bersaglio.

Tra l'involucro ed il capsido si trova il tegumento o matrice che contiene una serie di proteine importanti per la replicazione virale¹.

Tra di esse la pp65 è quella maggiormente rappresentata; inoltre per la sua elevata immunogenicità è utilizzata nella sierodiagnosi.

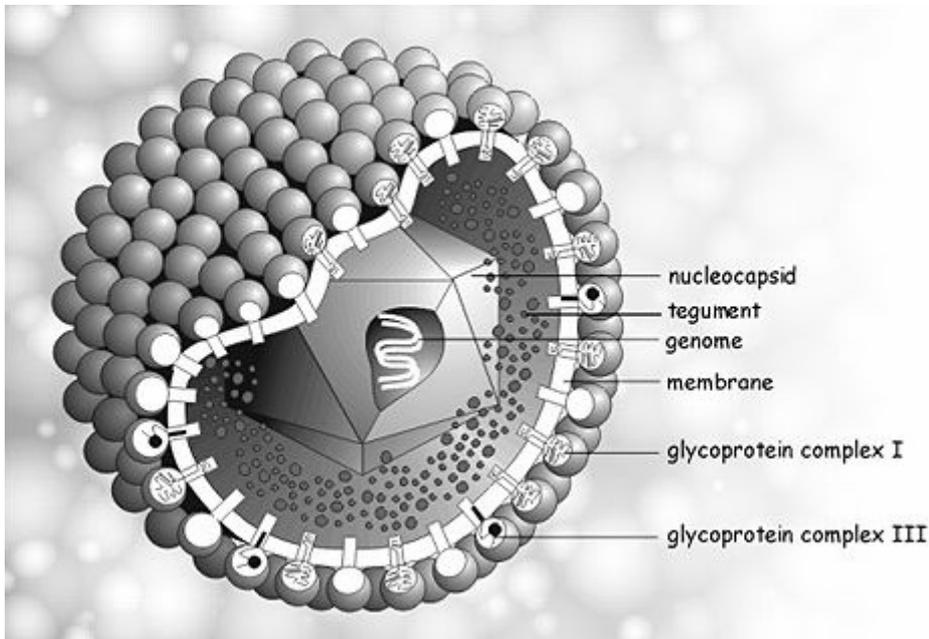


Figura 3: Rappresentazione della struttura del CMV.

La replicazione del virus avviene attraverso un processo complesso. Inizialmente vi è il contatto tra le proteine dell'involucro (glicoproteina gB e complesso glicoproteico gCII) e la membrana della cellula bersaglio, con successiva fusione delle due strutture. A questo punto capsidi e tegumento entrano nel citoplasma e si accumulano nei microtubuli: il genoma ed alcune proteine vengono portati nel nucleo dove il genoma virale lineare può diffondere e viene trasformato in epitoma. Non vi è integrazione tra genoma virale e quello della cellula bersaglio.

La replicazione virale provoca solitamente la lisi della cellula infettata. Le sedi di attiva replicazione sono le cellule epiteliali, le cellule endoteliali, i fibroblasti ed i megacariociti. Nelle cellule

infettate il CMV induce la formazione di caratteristiche inclusioni intranucleari ed un aumento fino a quattro volte del volume cellulare (citomegalia) con tipico aspetto ad “occhio di civetta”¹ (Figura 1 e 2).

Dopo l’infezione primaria (generalmente asintomatica o paucisintomatica) il virus persiste per tutta la vita nell’organismo, come avviene per tutti gli herpesvirus, allo stato latente, anche se non è chiaro in quale sede. Dalla latenza può riattivarsi in qualsiasi momento.

Sebbene ogni ceppo di CMV presenti una mappa genomica propria, tutti quelli isolati finora presentano un’omologia > 90%. Differenze sostanziali sono state osservate nel DNA di ceppi isolati in tempi diversi dagli stessi soggetti: pertanto, nel corso degli anni sono possibili sia riattivazioni che reinfezioni con altri ceppi virali.

Il CMV è uno dei più comuni patogeni virali responsabili di infezioni in età neonatale. L’infezione può essere acquisita *in utero* (infezione congenita da CMV), durante il parto o nell’immediato periodo post-natale. L’infezione da CMV è molto comune nel primo anno di vita, riguardando, a seconda del paese di appartenenza, dal 10% al 60% della popolazione infantile^{2, 3} Si ritiene che la fonte di infezione principale sia la madre, mentre altre fonti (nosocomiale, di comunità o da altri familiari) sembrano avere una rilevanza trascurabile. Il CMV, dopo aver causato l’infezione primaria materna, rimane allo stato latente da cui può riattivarsi dopo anni con conseguente escrezione nella saliva, nelle urine, nel tratto genitale e nel latte materno, nonostante la preesistenza della memoria immunitaria. Pertanto il feto, il neonato ed il lattante

possono infettarsi a seguito di una infezione primaria o di una riattivazione nella madre.

L'infezione congenita si verifica nello 0.5 – 2% dei nati ⁴: negli Stati Uniti, pertanto, ogni anno ci sono 40.000 nuovi casi di neonati infetti. Circa il 10% di questi bambini presenta segni clinici nel periodo neonatale (organomegalia viscerale, microcefalia con calcificazioni intracraniche, corioretinite e manifestazioni cutanee come petecchie e porpora). La presenza di segni clinici alla nascita è predittiva di una prognosi negativa caratterizzata soprattutto da alterazioni in ambito neurosensoriale ^{5, 6, 7}. Le sequele sono comunque un evento possibile anche in quei neonati che appaiono asintomatici alla nascita: infatti il 15% di queste infezioni congenite può presentare in età infantile sequele in campo uditivo ⁸. Il rischio di ipoacusia sembra essere correlato con la carica virale e può essere influenzato positivamente dalla terapia antivirale con ganciclovir ^{9, 10}.

Al contrario dell'infezione congenita, l'epidemiologia, le caratteristiche cliniche e le potenziali sequele dell'infezione perinatale da CMV sono molto meno chiare. Sappiamo che il CMV può essere acquisito durante il passaggio attraverso il canale del parto per esposizione alle secrezioni genitali infette o, nel periodo post-natale, mediante trasfusioni di sangue o per assunzione di latte materno infetto (ma, sebbene più raro, anche da contatto con altre secrezioni materne infette come la saliva, o da contatto con altre persone come i familiari ed il personale medico-infermieristico).

Alcuni autori hanno osservato che la riattivazione del CMV nel tratto genitale al momento del parto riguarda il 12% delle donne, con un tasso di trasmissione post-natale pari al 40%, mentre la riattivazione del virus nel faringe o nel tratto urinario non è risultata responsabile di trasmissione dell' infezione al bambino ¹¹.

Nonostante la possibilità di trasmissione post-natale sia nota da molti anni, il suo potenziale patogeno soprattutto nei neonati prematuri è stato indagato soltanto negli ultimi anni e non è ancora ben definito.

TRASMISSIONE DEL CMV attraverso il LATTE MATERNO NEL NEONATO A TERMINE

Il primo caso di isolamento del CMV nel latte materno è stato riportato da Diosi nel 1967¹² e successivamente confermato da studi pubblicati da Hayes e colleghi nel 1972¹³. Usando la tecnica di isolamento virale mediante coltura cellulare, il CMV fu isolato nel latte di 17/63 donne sieropositive e non si riscontrarono differenze nel tasso di isolamento nel latte a seconda che queste donne presentassero o meno viruria, suggerendo che la riattivazione del CMV nella ghiandola mammaria sia regolato da meccanismi diversi da quelli che controllano la riattivazione in altri compartimenti. Nel 1980 Stagno ha rivalutato il pattern della virolactia e della infezione del neonato¹⁴. In questo studio è stato valutato il colostro o il latte materno di 278 donne e si è osservata l'escrezione del CMV nel latte in 38 donne (13%). Il tasso di isolamento del CMV nel latte era più alto nelle donne che avevano partorito neonati con infezione congenita (68%) e più basso nelle donne che non eliminavano il virus da nessuna altra sede (9%). Si osservò che il latte materno infetto era incapace di infettare una coltura cellulare, probabilmente per la presenza di IgA CMV-specifiche presenti nel latte materno. I bambini nati da 28 donne che eliminavano il virus nel latte vennero seguiti in modo prospettico: 19 di questi erano alimentati al seno e 9 erano alimentati con latte artificiale; nessuno di questi 28 bambini presentava infezione congenita o aveva ricevuto trasfusioni di sangue. Nessuno dei bambini alimentati con latte artificiale presentò infezione da CMV, mentre 11/19 bambini allattati al seno acquisirono l'infezione nonostante la presenza di anticorpi neutralizzanti il virus di origine materna. Non si evidenziò alcuna differenza tra le donne che trasmisero e quelle che non trasmisero il virus al proprio bambino riguardo l'età, la razza, la durata dell'allattamento, la durata

dell'escrezione del CMV nel latte, la presenza di IgA specifiche o la carica virale presente nel latte. Inoltre non furono evidenziati segni di malattia clinicamente evidente (incluso alterazioni neurosensoriali) nei bambini infetti che sono stati seguiti in follow up fino ad una età media di 51 mesi.

Poiché questo studio dimostrava che l'infezione post-natale da CMV attraverso il latte materno non causa una malattia apparente, gli autori hanno ipotizzato che questa forma di trasmissione debba essere considerata come "*una forma di immunizzazione naturale*" e che pertanto ogni ipotesi di rischio associato alla trasmissione del CMV via latte materno debba essere valutata tenendo presente il "*ben definito valore del latte materno*" ¹⁴. Gli autori, però, concludevano dichiarando che in caso di bambini nati da madri sieronegative o neonati prematuri bisogna prestare maggiore attenzione nella somministrazione di latte infetto. Gli stessi autori successivamente hanno seguito in follow up 41 donne sieropositive ed i loro 41 bambini ¹⁵: 12 di questi (30%) vennero infettati dal latte materno e la trasmissione del virus si rivelò più probabile in caso di durata dell'allattamento superiore ad un mese e in caso di latte con esame colturale positivo. In particolare tra i bambini infettati c'erano due prematuri di cui uno sviluppò un quadro di polmonite e l'altro venne infettato da latte di donna donatrice.

Successivamente ci sono state altre segnalazione sul potenziale danno da infezione post-natale da CMV in neonati prematuri ^{16, 17, 18}, ma devono passare altri 15 anni perché la trasmissione del CMV attraverso il latte materno al neonato pretermine venisse accuratamente riesaminata.

TRASMISSIONE DEL CMV attraverso il LATTE MATERNO NEL NEONATO A PREMATURO

Nel soggetto immunocompromesso, l'infezione da CMV si presenta con segni clinici severi come epatite, anemia emolitica, polmonite, miocardite, pericardite, e possibile coinvolgimento del sistema nervoso centrale. Allora il neonato pretermine, poiché ha un sistema immune immaturo e la sua nascita si verifica prima del passaggio della gran parte degli anticorpi materni (che inizia alla 28^a settimana di gestazione), può essere candidato a forme di malattia gravemente sintomatica a seguito di una infezione primaria da CMV. Yeager et al ¹⁶ valutando l'andamento degli anticorpi anti-CMV materni acquisiti dal bambino per via transplacentare, hanno osservato che la loro concentrazione diminuisce nel tempo più rapidamente nei prematuri rispetto ai neonati a termine: in particolare nel pretermine essi si riducono nettamente a 4-6 settimane di età e scompaiono nel 32% dei casi a 7-9 settimane di vita. Ciò probabilmente contribuisce a rendere il prematuro più suscettibile all'infezione post-natale ed alle forme sintomatiche di questa. Infatti in letteratura sono stati riportati casi clinici ¹⁹ e studi su piccolo numero di pretermine ^{20, 21} di malattia severa a seguito di infezione da CMV di probabile origine post-natale.

Gli aspetti clinici e virologici della trasmissione del CMV via latte materno al neonato prematuro di basso peso sono stati esaminati negli ultimi 9 anni da un gruppo di virologi e neonatologi di Tubingen (Germania). Nel loro primo lavoro ²² hanno studiato 56 madri ed i loro rispettivi 67 bambini prematuri: 23/27 donne CMV positive (85%) eliminavano il virus nel latte e 25/27 (93%) avevano il latte positivo per la metodica PCR (Polymerase Chain Reaction) che evidenzia la presenza di DNA virale. Lo studio prospettico ha mostrato che mentre l'eliminazione virale nel latte materno inizia

entro 4 settimane dal parto con un picco tra le 3 e le 4 settimane (solo 2/23 donne hanno iniziato l'eliminazione a 6 e 8 settimane post-partum), il DNA è positivo più precocemente (1^a settimana post-partum: 70% di positività per il DNA e 30% per il virus infettante). L'eliminazione del virus nel latte materno si è protratta da 1 fino a 15 settimane. Tutte le donne con virolactia non hanno presentato segni clinici di malattia e la loro sierologia è rimasta invariata (IgG positive, IgM negative).

Nello stesso studio è stato riscontrato un tasso di infezione tra i prematuri alimentati con latte materno CMV positivo pari al 59% (17/29). Le donne con latte CMV positivo non eliminavano contemporaneamente il virus nella saliva o nelle urine, a testimonianza che la riattivazione e la replicazione del virus, verosimilmente triggerate dall'inizio della lattazione, possano essere mediate da fenomeni che si verificano localmente nella ghiandola mammaria e che non sono la conseguenza di una riattivazione sistemica. Cinque prematuri che avevano acquisito l'infezione attraverso il latte materno hanno presentato una forma clinica denominata "sindrome sepsis-like" che consiste in apnea, bradicardia, distensione intestinale, pallore, malperfusionazione cutanea associate ad anomalie di dati laboratoristici quali neutropenia, piastrinopenia e rialzo degli indici di flogosi (Figura 4). Il peggioramento clinico si è verificato solo in quei neonati prematuri che si sono infettati prima dei due mesi di vita. Pertanto questo studio concludeva dichiarando che è *"sicuramente utile inattivare il CMV nel latte materno"* per evitare la trasmissione dell'infezione e le gravi manifestazioni cliniche in questo gruppo di neonati ad alto rischio.

Lo stesso gruppo di ricercatori tedeschi ha continuato in seguito a studiare l'epidemiologia e le manifestazioni cliniche dell'infezione da CMV acquisita attraverso il latte materno in neonati prematuri. In uno studio che coinvolgeva 151 madri ed i

loro 176 neonati prematuri (età gestazionale EG < 32 settimane o peso neonatale PN < 1500 g) hanno osservato un tasso di riattivazione del virus nel latte materno pari al 93% (73 su 76 madri sieropositive per CMV) utilizzando la tecnica di PCR ²³.

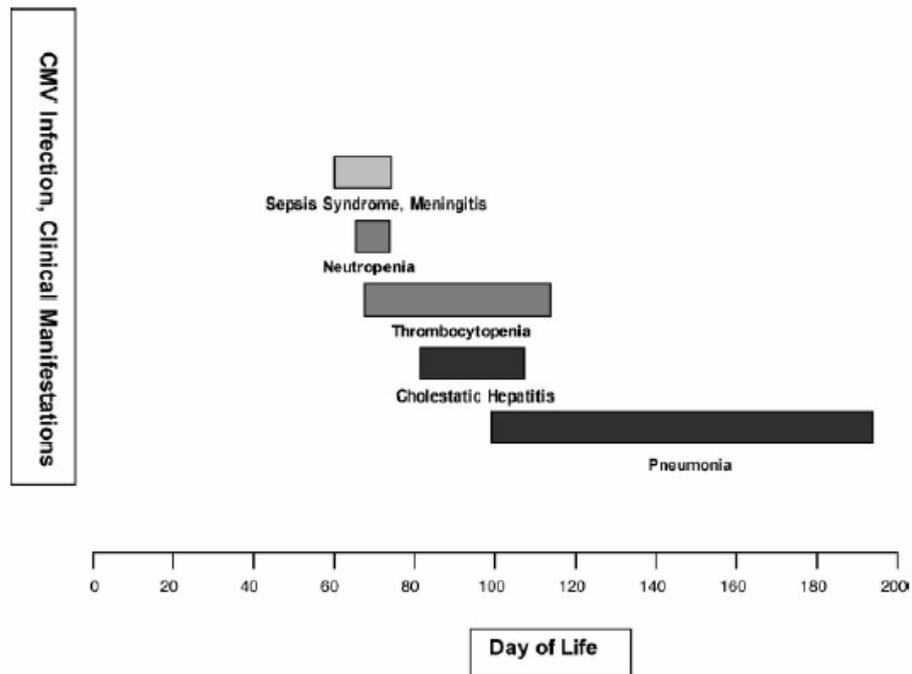


Figura 4: Sequenza temporale delle manifestazioni cliniche dell'infezione da CMV via latte materno in un prematuro di 25 settimane di età gestazionale che ha sviluppato un quadro di sindrome settica da CMV caratterizzata da meningite asettica, neutropenia, trombocitopenia, epatite colestatica e polmonite. I segni e sintomi della malattia sono iniziati a 60 giorni di vita e l'infezione da CMV è stata confermata da isolamento del virus nelle urine, saliva e liquido ottenuto dal broncolavaggio. L'analisi del latte materno che era stato congelato, ha identificato una alta concentrazione di DNA del CMV. La polmonite si è risolta gradualmente a partire dai 180 giorni di vita ²².

In questo studio i fattori di rischio più importanti per la trasmissione del virus erano rappresentati dalla precoce eliminazione del virus nel latte e dalla presenza di virus infettante. Il tasso di trasmissione ai bambini prematuri è risultato pari al 37% (27 delle 73 madri con riattivazione del virus nel latte hanno trasmesso il virus ai loro 33 bambini prematuri). L'infezione neonatale si verificava in media a 42 giorni di vita. Inoltre questo studio ha escluso la possibilità di altre vie di infezione (nosocomiale, di comunità) mediante la dimostrazione dello stesso genotipo virale nel latte materno e nelle urine del bambino. Tra i 33 prematuri infettati, 16 (48%) erano sintomatici nel periodo che va da una settimana prima a due settimane dopo il primo riscontro di urine positive per CMV (PCR o isolamento colturale). In tutti i casi la sintomatologia si è risolta spontaneamente entro 7 settimane e non ci sono stati esiti fatali. Sono stati osservati:

- 14 casi di neutropenia (< 1500 Neutrofili/ μ l) di cui 10 casi con valori compresi tra 335 e 906 N/ μ l ;
- 4 casi di piastrinopenia (< 150 piastrine/nl) di cui un caso con petecchie;
- 4 casi di sindrome "sepsis-like" (apnea – bradicardia – intenso pallore) di cui due hanno necessitato di reintubazione per la gravità delle apnee; in tutti i casi le emocolture erano negative ed in concomitanza con i sintomi si riscontrava la positività della PCR su sangue o urine, mentre la coltura sulle urine si positivizzava due settimane più tardi;
- 5 casi di interessamento epatico di cui 4 casi con aumento delle transaminasi (GOT > 38 U/l; GPT > 30 U/l) ed 1 caso di epatite;
- 2 casi di mioclonie con EEG nella norma e risoluzione spontanea.

E' stata osservata una correlazione tra PN, età anagrafica al momento dell'infezione e presenza di sintomi: i prematuri con maggior PN e tardiva trasmissione del virus sembrano avere

maggiori probabilità di acquisire una infezione primaria da CMV asintomatica come nel caso di un neonato a termine.

Dopo la comparsa di queste segnalazioni, altri ricercatori hanno iniziato a studiare le caratteristiche virologiche ed epidemiologiche della malattia da CMV nei neonati prematuri e la maggior parte dei lavori hanno riportato tassi di trasmissione e di malattia sintomatica nei prematuri molto più bassi di quelli evidenziati dal gruppo tedesco. Queste differenze possono essere dovute al metodo di conservazione del latte materno, a seconda che il latte somministrato fosse latte materno fresco- refrigerato o congelato.

Uno studio prospettico condotto a Nagoya (Giappone) su 24 madri sieropositive e sui rispettivi 34 neonati prematuri (EG < 34 settimane o PN < 2000 g) ha evidenziato che 21 di queste donne (88%) presentavano CMV DNA presente nel latte ma solo 3/30 bambini (10%) esposti al latte positivo per CMV si è infettato e nessuno di questi 3 ha presentato un decorso sintomatico dell'infezione ²⁴. Gli autori hanno sottolineato che il latte materno somministrato ai bambini era stato precedentemente congelato e che questo può spiegare il motivo del basso tasso di trasmissione osservato.

Analogamente un altro studio prospettico condotto in Taiwan su 38 coppie madre-bambino (EG < 35 settimane, PN < 1500 g) in cui il latte materno veniva somministrato dopo congelamento ha osservato un tasso di trasmissione del CMV pari al 15 % (6 su 41 prematuri esposti al latte infetto), e non ha trovato differenze significative nell'incidenza di "sepsis sindrome" tra i bambini infettati e quelli non infettati ²⁵.

In uno studio condotto a Berlino (Germania) sono state seguite e monitorate 73 madri ed i loro 89 neonati prematuri (EG < 28 settimane, PN < 2000 g): in 48/73 madri (66%) l'esame in PCR ha evidenziato CMV DNA nel latte e 20/48 neonati esposti al latte

infettato hanno acquisito l'infezione da CMV (42%)²⁶. Gli autori segnalano che la pratica più comune nel loro reparto è quella di alimentare i prematuri con latte fresco e che la pratica di congelamento del latte materno è solo occasionale. L'infezione si è manifestata clinicamente in 2 dei 20 neonati infettati (10%): in un caso si è osservata una epatite colestatica e nell'altro una forma di "sepsis sindrome".

In un altro studio eseguito a Toronto su 65 neonati VLBW (Very Low Birth Weight, Peso Neonatale < 1500 g) nati da 56 madri CMV positive, 4 neonati (6.2%) hanno presentato isolamento virale nelle urine positivo ed uno di questi ha presentato una infezione clinicamente evidente²⁷. I prematuri infettati erano stati alimentati nel primo mese di vita con una maggior percentuale di latte fresco rispetto ai bambini che non si sono infettati (latte fresco pari al 15.3% della quota totale nell'arco di un mese nei bambini infetti e pari al 3.2 % nei non infetti).

Infine in uno studio condotto in Israele sono stati monitorati 96 bambini VLBW (EG < 32 settimane, PN < 1500 g) alimentati prevalentemente con latte materno fresco²⁸. La trasmissione del virus si è verificata in 4/70 (5.7%) bambini esposti al latte infetto vs 0/26 bambini alimentati con latte negativo in quanto prodotto da madri CMV negative o alimentati con formula. Solo un bambino ha presentato una malattia clinicamente evidente caratterizzata da epatite severa associata ad instabilità emodinamica, mentre in altri due casi sono state osservate solo anomalie ematologiche. Questo studio sebbene fornisca dati piuttosto rassicuranti sull'uso di latte fresco nei prematuri ad alto rischio ha delle importanti limitazioni: mancano infatti i dati virologici relativi al latte e la diagnosi di infezione del neonato è basata su un solo test (PCR su urine).

Nel 2004 Gessler et al.²⁹ hanno riportato un caso di enterocolite necrotizzante (NEC) in un gemello nato da parto cesareo all'EG di 29 settimane + 6 giorni e PN 1490 g (l'altro

gemello di PN 1530 g è sempre stato CMV negativo). La madre aveva eseguito controlli sierologici per CMV in gravidanza ed era sempre stata IgG positiva ed IgM negativa. La sintomatologia è comparsa a 6 giorni di vita quando ha presentato un peggioramento clinico con crisi di apnea, bradicardia e distensione addominale con sangue nelle feci; il quadro radiologico mostrava pneumatosi intestinale ed il quadro laboratoristico era positivo per infezione mentre l'emocoltura e l'urinocoltura erano negative. L'alimentazione con latte materno è stata interrotta per 6 giorni ed è stata intrapresa terapia antibiotica. A 6 settimane di vita mostrava nuovamente segni clinici di infezione (cute mazzata, febbre, epatosplenomegalia e trombocitopenia); le colture di sangue, urine e feci erano ancora negative ma l'isolamento del CMV nelle urine risultava positivo, come pure il CMV DNA nel latte materno, mentre la sierologia del bambino era negativa per IgG ed IgM. A 10 settimane di vita mostrava un nuovo peggioramento clinico associato a distensione addominale: l'RX addome mostrava un quadro di stenosi intestinale per cui è stato sottoposto ad intervento chirurgico di escissione dei tratti stenotici e successiva anastomosi. L'esame del pezzo biptico mostrava ulcerazione ed infiammazione granulosa di mucosa e sottomucosa e la presenza del CMV nelle cellule endoteliali. La coltura del CMV nelle urine era ancora positiva. Gli emoderivati utilizzati erano privi di CMV. Alla dimissione non si evidenziavano sequele e l'esame neurologico era nella norma. Sebbene l'enterite da CMV sia stata documentata nel paziente immunocompromesso adulto e pediatrico, sono pochi i casi neonatali di NEC associata ad infezione da CMV riguardanti o la fase acuta³⁰ o la fase delle complicanze^{31, 32}. Resta comunque impossibile stabilire se i sintomi comparsi a 6 giorni di vita siano ascrivibili al CMV trasmesso dal latte materno, visto che a quel tempo non sono stati eseguiti accertamenti virologici né sulla madre e né sul bimbo.

In diverse regioni del mondo sono stati eseguiti molti studi sul rischio di infezione da CMV del neonato prematuro attraverso il latte materno. In conclusione, però, il tasso di infezione neonatale e il tasso di malattia clinicamente evidente sono risultati molto variabili, come conseguenza dei differenti disegni degli studi condotti, differente definizione di infezione da CMV e di malattia nel neonato e di diverse pratiche di alimentazione nelle varie UTIN (Unità di Terapia Intensiva Neonatale) in relazione alle quantità di latte fresco o congelato somministrate ai bambini.

FATTORI VIRALI E DELL'OSPITE CHE MODULANO LA TRASMISSIONE DEL CMV ATTRAVERSO IL LATTE MATERNO

I fattori che regolano la trasmissione del CMV al bambino e che determinano una malattia clinicamente evidente sono ancora poco conosciuti. Come osservato in precedenza, gli studi eseguiti in neonati a termine hanno dimostrato che la trasmissione del CMV via latte materno si verifica nonostante la presenza di anticorpi anti-CMV di origine materna e che non ci sono differenze tra le donne che trasmettono e quelle che non trasmettono il virus al proprio bambino relativamente all'età, razza, durata dell'allattamento, durata dell'eliminazione del CMV nel latte, presenza di IgA CMV-specifiche o titoli di virus presente nel latte¹⁴.

Comunque una recente esamina dei dati ha trovato una associazione tra la carica virale (determinata usando la PCR quantitativa) e la trasmissione del virus al neonato³³. Inoltre questo studio ha trovato una correlazione tra i livelli di lattoferrina (antimicrobico endogeno presente nel latte materno) e la prevenzione della trasmissione del CMV al bambino.

Uno studio prospettico ha osservato che sia il virus infettante che il suo DNA sono evidenziabili più precocemente nel latte delle donne che trasmettono rispetto al latte delle donne che non infettano il proprio bambino^{23, 34}.

Le differenze osservate nella riattivazione del CMV rispetto all'inizio della lattazione e nei livelli di DNA presenti nel latte possono essere una conseguenza della variabilità della locale risposta immune cellulare. Un recente studio ha caratterizzato il fenotipo delle cellule T CD8+ extralinfoidi nel latte materno di donne HIV positive e HIV negative ed ha trovato delle caratteristiche cellulari riferibili a cellule di memoria, differenti rispetto a quelle presenti nel sangue³⁵.

INFEZIONE DA CMV ACQUISITA ATTRAVERSO IL LATTE MATERNO: QUALI SEQUELE A DISTANZA?

Poiché l'infezione da CMV acquisita in utero può causare sequele a distanza nello sviluppo neurologico ed in particolare deficit neurosensoriali, è lecito presupporre che una trasmissione del CMV in epoca post-natale via latte materno possa provocare sequele analoghe soprattutto in neonati VLBW.

In letteratura esistono pochi dati sullo sviluppo psicomotorio dei bambini con infezione da CMV acquisita attraverso il latte materno e comunque non è stata evidenziata alcuna forma di sequela.

La valutazione psicometrica e la valutazione della funzione visiva ed uditiva eseguite su 39 bambini a termine infettati attraverso il latte materno non hanno evidenziato anomalie ad un'età media di 51 mesi ¹⁴.

Lo stesso tipo di risultati rassicuranti sono disponibili per la popolazione di neonati prematuri. In uno studio caso-controllo sono stati valutati 22 prematuri con infezione da CMV post-natale precoce (acquisita via latte materno) e 22 prematuri CMV negativi raggruppati per EG, PN ed altre complicanze associate alla prematurità come l'emorragia intracranica o la durata della ventilazione meccanica. Sono state eseguite valutazioni audiometriche dai 2 ai 4.5 anni di vita e nessun bambino in entrambi i gruppi ha mostrato deficit neurosensoriali. Sebbene siano stati evidenziati dei casi di anomalie di sviluppo motorio o di linguaggio, questi risultati non sono risultati diversi nei due gruppi ³⁶.

In un altro piccolo gruppo di prematuri con infezione da CMV da latte materno (4 bambini) il follow up audiologico eseguito fino ai 2 anni di età non ha messo in evidenza anomalie audiologiche ²⁸.

Nel 2006 il gruppo tedesco di Tubingen ha pubblicato i risultati di uno studio caso-controllo sui sintomi neonati e sull'outcome di prematuri infettati dal CMV trasmesso attraverso il latte materno³⁷. I 40 bambini infettati mostrano, rispetto ai non infetti, un più basso valore minimo di conta piastrinica e di neutrofili, un valore più alto di Proteina C Reattiva e mostrano più frequentemente episodi di transitoria granulocitopenia e piastrinopenia. Non sono state evidenziate differenze tra i due gruppi circa gli outcome maggiori della prematurità (emorragia intraventricolare, leucomalacia, retinopatia della prematurità > 2° grado, NEC e broncodisplasia); inoltre non sono state registrate differenze circa la durata della ventilazione meccanica, durata del ricovero, o peso e circonferenza cranica alla dimissione. Pertanto lo studio conclude affermando che l'infezione post-natale da CMV è più frequentemente associata ad anomalie ematologiche e a colestasi, mentre non influenza negativamente l'outcome a distanza.

Da questo risultato sono scaturite importanti considerazioni sulla diversa evoluzione clinica dell'infezione da CMV in epoca prenatale e post-natale. Il primo aspetto da considerare è che l'infezione post-natale avviene attraverso il tratto gastro-intestinale mentre l'infezione congenita avviene attraverso il sangue. Inoltre bisogna tener presente che le madri dei bambini con infezione congenita non hanno ancora prodotto anticorpi nel momento in cui il feto viene infettato, e questo può giustificare la maggiore aggressività dell'infezione. Nel caso del prematuro (tenendo conto che gli anticorpi materni passano la placenta a partire dalla 28° settimana di EG) l'infezione post-natale può essere mitigata clinicamente proprio dalla presenza di anticorpi materni. Una testimonianza di ciò sta nel caso di infezione da CMV legata a trasfusione di emoderivati infetti: la sintomatologia si sviluppava solo nei bambini nati da madri sieronegative (e quindi che non avevano passato i loro anticorpi al bambino).

PREVENZIONE DELL'INFEZIONE DA CMV TRASMESSA ATTRAVERSO IL LATTE MATERNO

I dati della letteratura che abbiamo esaminato finora hanno generato molti dubbi sul tipo di alimentazione da adottare nel prematuro: infatti accanto alle preoccupazioni circa l'eventuale trasmissione dell'infezione con possibili manifestazioni cliniche anche severe bisogna considerare gli innumerevoli vantaggi che il latte materno offre soprattutto a questa categoria di prematuri. Il problema si ripercuote anche sull'utilizzo di latte di banca, soprattutto se il latte proviene da un pool di donatrici in quanto ciò aumenta le probabilità di presenza di CMV. In particolar modo sarebbero a rischio i nati da madre sieronegativa che quindi non hanno anticorpi materni protettivi. Pertanto lo sforzo comune, in attesa di dati più chiari circa la trasmissione via latte materno del CMV, è di prevenire l'infezione post-natale mediante trattamenti che eliminino dal latte il virus. Sono stati proposti numerosi interventi per inattivare il CMV (ed altri virus capsulati) nel latte materno, ma questi comportano spesso la distruzione di importanti sostanze di natura immunologica o nutrizionale e pertanto ancora non si è arrivati ad una linea di condotta comune..

Uno dei metodi più noti di inattivazione del CMV è la pastorizzazione: il metodo tradizionale tipo Holder (pastorizzazione per 30 minuti a 62.5°C) elimina completamente il virus infettante dal latte^{38, 39, 40}, ma contemporaneamente distrugge componenti del latte materno che hanno funzione nutritiva come IgA, IgM, lattoferrina e le capacità funzionali dei leucociti. L'inattivazione del virus è temperatura-dipendente: infatti la pastorizzazione a 56°C per 30 minuti non è in grado di eliminare completamente il virus infettante.

Negli anni '80 è stato proposto un sistema di trattamento del latte per un tempo breve ad alte temperature (72°C per 5-10

secondi): tale sistema è in grado di inattivare completamente il virus ⁴¹ (35), elimina la crescita di batteri endogeni e l'infettività del CMV aggiunto in vitro, mentre sembra non alterare le proprietà nutritive ed immunologiche del latte materno ⁴¹. In particolare non vengono distrutte le vitamine B1, B2, B6 e C, l'acido folico, la lattoferrina, le IgA secretorie, le immunoglobuline, il lisozima ed altri enzimi. Purtroppo il sistema che attua il trattamento rapido ad alte temperature non è al momento in commercio.

Il congelamento è un sistema alternativo alla pastorizzazione e una serie di studi condotti negli anni '70 e '80 hanno dimostrato che esso è efficace nell'inattivazione di virus capsulati e in grado di preservare le proprietà benefiche del latte. Infatti il congelamento del latte a -20°C riduce il potere infettante del CMV soprattutto se protratto per più di 7 giorni, ma non è in grado di eliminare completamente il virus dal latte specie se la carica virale è alta ^{39, 42, 43, 44}.

Sulla base dei risultati descritti la Red Book Committee dell'American Academy of Paediatrics (AAP) nel 2003 ha posto indicazione al congelamento del latte materno prima della somministrazione a neonati VLBW nel caso in cui non sia possibile escludere la probabilità di trasmissione del CMV ⁴⁵.

Nello stesso anno sono state pubblicate le raccomandazioni dell'Austrian Society of Paediatrics che prevedono la procedura di pastorizzazione Holder fino al raggiungimento dell'età post-concezionale di 34 settimane in caso di campione di latte positivo destinato a bambini prematuri ⁴⁶.

Un'altra soluzione prevista per la prevenzione della trasmissione del CMV attraverso il latte materno è quella di somministrare ai prematuri solo latte di donna sieronegativa per CMV ⁴⁷.

In altri centri si applicano pratiche preventive che consistono nello screening sierologico delle madri che allattano per identificare le donne a rischio di trasmissione del virus o programmi di

screening basato sul metodo PCR eseguito nel latte prima della somministrazione. Si tratta comunque di soluzioni parziali in quanto, spesso per avere i risultati di questi screening sono necessari diversi giorni.

In un recente editoriale ⁴⁸ che ha valutato il rapporto rischio/beneficio nell'allattamento materno per i prematuri si è concluso che in attesa di dati ulteriori, al momento nel neonato prematuro è appropriato l'utilizzo del latte fresco della propria madre.

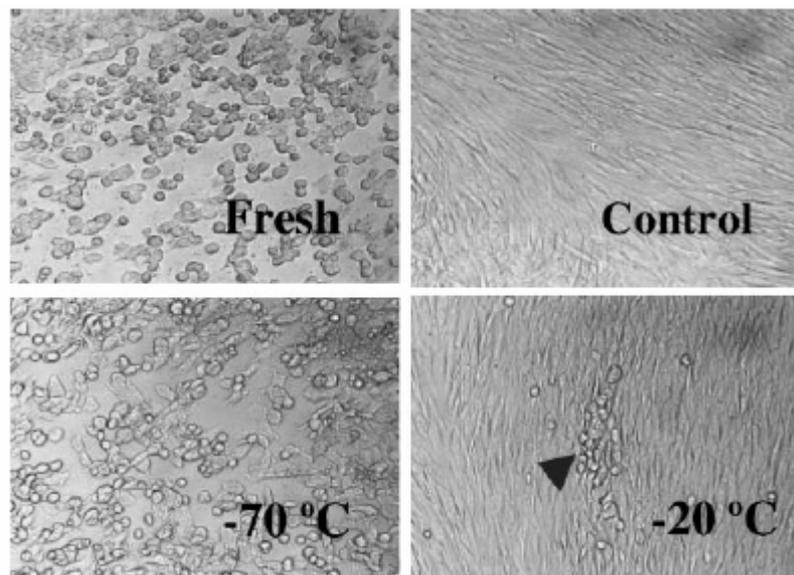


Figura 5: Crescita su fibroblasti umani di CMV proveniente dal latte di donna fresco, congelato a -70°C per 7 giorni prima della semina o congelato a -20°C per 7 giorni prima della semina; nel controllo la coltura in fibroblasti è stata eseguita con latte non infetto. Sia il campione fresco che quello congelato a -70°C mostrano un esteso effetto citopatico. Al contrario il latte congelato a -20°C riduce la carica virale oltre il 90% se paragonato al latte fresco, ma non elimina completamente il virus infettante.

Pertanto il problema dell'inattivazione del CMV nel latte materno rimane aperto, e restano i dubbi sul tipo di alimentazione da adottare in caso di nascita pretermine.

Un altro aspetto nel controllo della malattia da CMV riguarda la strategia profilattica o terapeutica utile a prevenire/trattare la malattia sintomatica nel bambino infettatosi via latte materno. In uno studio italiano il 20% dei neonati prematuri esposti al latte materno infetto hanno acquisito l'infezione ma non sono stati evidenziati casi sintomatici. E' stato suggerito che questo dato potesse essere correlato alla routinaria somministrazione di Immunoglobuline umane ev (IVIG) in caso di nascita prematura: infatti le IVIG contengono alti titoli di anticorpi anti-CMV e questi, sebbene non siano capaci di prevenire l'infezione, possano rendere l'infezione meno aggressiva⁴⁹.

L'eventuale impiego della terapia antivirale in caso di bambini infettati che mostrano un quadro di "sepsis syndrome" è stato oggetto di ulteriori discussioni tra gli esperti in materia, ma non vi è una opinione prevalente sulle altre. Sicuramente è corretto valutare per "sepsis syndrome" mediante PCR per CMV nel sangue ed eventuale isolamento virale ogni prematuro alimentato con latte materno che mostri peggioramento del quadro clinico con epatosplenomegalia, polmonite e anomalie ematologiche.

Obiettivi del presente studio sono:

- stabilire la capacità del CMV di infettare il neonato prematuro attraverso il latte materno;
- definire eventuali fattori di rischio o protettivi per l'infezione post-natale e per il manifestarsi di essa con sintomatologia clinica.

MATERIALI E METODI

POPOLAZIONE STUDIATA

Lo studio comprende neonati prematuri di EG \leq 32 settimane e PN < 1500 g (VLBW infants) nati dal dicembre 2003 all'agosto 2006, allattati con latte materno per almeno un mese e le loro rispettive madri. Tutti i bambini studiati sono nati nel nostro Policlinico, sono stati ricoverati subito dopo la nascita presso la nostra UTIN e seguiti durante tutto il periodo della degenza. I bambini che hanno presentato infezione post-natale da CMV sono stati seguiti in follow up fino all'età di 2/3 anni con controlli trimestrali nel primo anno di vita e semestrali successivamente.

Dallo studio sono stati esclusi i neonati:

- polimalformati;
- con malattia cardiaca congenita o idrope fetale;
- con infezione congenita da CMV (isolamento del CMV nelle urine positivo nella prime tre settimane di vita);
- con infezione perinatale da CMV (tampone vaginale materno positivo per CMV al momento del parto in caso di nascita per via vaginale).

Presso il nostro centro vengono utilizzati di routine in tutti i prematuri globuli rossi concentrati irradiati e sottoposti a processo di filtrazione allo scopo di prevenire la trasmissione del virus mediante trasfusione con sangue infetto.

L'alimentazione enterale è stata iniziata quando le condizioni cliniche generali si sono stabilizzate (in genere entro 48 ore di vita). E' stato utilizzato per ogni bambino il latte della propria madre refrigerato a 4°C per un massimo di 24 ore e somministrato inizialmente mediante gastroclisi o gavage. Presso il nostro centro non viene utilizzato il latte di banca.

Nel caso in cui la produzione materna fosse diventata insufficiente rispetto alle esigenze nutrizionali del bambino

inizialmente è stato utilizzato il latte materno in eccedenza che era stato nel frattempo congelato a -20°C , e successivamente è stata utilizzata la supplementazione con latte formulato per pretermine (scelto secondo un calendario di rotazione prestabilito).

Inoltre al raggiungimento della tolleranza alimentare di 100 ml/Kg di peso corporeo, il latte materno è stato addizionato con fortificante proteico.

I bambini sono stati dimessi dal nostro reparto al raggiungimento della stabilità delle condizioni cliniche e di un peso corporeo > 1900 gr.

DISEGNO DELLO STUDIO

Al momento dell'arruolamento (entro due giorni dal parto) è stata eseguita nei bambini la ricerca del CMV nelle urine (PCR qualitativa ed isolamento virale) per evidenziare una eventuale infezione congenita; nello stesso tempo in tutte le madri è stato eseguito un prelievo venoso per la determinazione della sierologia IgG ed IgM per CMV. Inoltre, solo nel caso di parto per via vaginale, è stata eseguita la ricerca del CMV sul tampone vaginale materno mediante isolamento al fine di escludere l'eventuale trasmissione attraverso secrezioni cervico-vaginali infette.

Durante le prime due settimane post-partum il CMV è stato ricercato nel latte materno mediante isolamento virale. In tutti i campioni di latte delle madri con isolamento positivo è stata eseguita anche PCR quantitativa per valutare l'andamento della carica virale.

La ricerca del CMV nelle urine del bambino e nel latte materno è stata ripetuta settimanalmente fino alla dimissione e

successivamente con cadenza mensile fino al raggiungimento dell'età post-concezionale di 40 settimane.

Inoltre ogni 15 giorni sono stati eseguiti controlli clinico-laboratoristici (emocromo con piastrine; indici di flogosi; indici di funzionalità epatica).

L'ecografia cerebrale è stata eseguita entro le prime 4 settimane di vita e controllata successivamente secondo l'indicazione clinica.

Il fundus oculi è stato eseguito a 3-4 settimane di vita e, se normale, ripetuto ad EG=40 settimane, altrimenti secondo l'indicazione dell'oculista.

La valutazione dei sintomi clinici è stata eseguita prospetticamente mediante esame obiettivo quotidiano ed eventuale registrazione di apnee, bradicardia, mazzatura cutanea, epatomegalia, petecchie, distensione addominale, sintomi neurologici. In caso di sintomi suggestivi per infezione da CMV sono stati ripetuti i controlli sulle urine del bambino (PCR qualitativa ed isolamento virale) e dei parametri laboratoristici (emocromo, piastrine, funzionalità epatica, indici di flogosi, emocoltura).

I dati anamnestici della madre e del bambino sono stati raccolti in modo prospettico:

- alla nascita (caratteristiche anagrafiche della madre, EG, PN, sesso, modalità di parto);

- durante la degenza (modalità di assistenza respiratoria, persistenza del dotto arterioso, durata della supplementazione di ossigeno, numero di trasfusioni di emoderivati, infezioni nosocomiali, emorragia cerebrale, leucomalacia periventricolare, retinopatia della prematurità, enterocolite necrotizzante); inoltre sono stati registrati i valori degli esami ematochimici eseguiti dopo i primi 3 giorni di vita: eventuali anomalie sono state annotate solo

se non vi era altra causa nota (alterazione degli indici di flogosi, neutropenia o piastrinopenia in corso di infezione batterica etc..)

- alla dimissione (durata del ricovero, mortalità, EG e peso alla dimissione);

- durante il follow up (parametri auxologici, valutazione della funzione visiva ed uditiva, valutazione psicomotoria).

I criteri adottati per definire la trasmissione post-natale del CMV attraverso il latte materno sono:

1. presenza del CMV (isolamento virale e/o PCR positivi) nel latte materno;
2. isolamento virale e PCR qualitativa positivi per CMV nelle urine del bambino;
3. esclusione della trasmissione *intranatale* (tamponi vaginale materno negativo per CMV in caso di parto spontaneo), *congenita* (isolamento negativo per CMV nelle urine del bambino nei primi 7 giorni di vita) o *da trasfusione* (utilizzo di globuli rossi concentrati filtrati).
4. analisi del genotipo virale della madre (materiale esaminato: latte) e del prematuro (materiale esaminato: urine) per stabilire con certezza la fonte di infezione.

METODICHE

ISOLAMENTO VIRALE (metodo *shell vial*)

Questa tecnica utilizza colture in monostrato di fibroblasti umani; essi sono coltivati in un terreno MEM –Eagle’s minimal essential medium- con aggiunta di 10% di siero bovino fetale, levoglutammina, penicillina e vancomicina. I fibroblasti vengono adesi a vetrini posti in piastre di plastica da 24 pozzetti. I campioni di urina o saliva vengono inoculati nelle cellule fibroblastiche. Le piastre vengono centrifugate a 700 g per 60 minuti a 37°C per facilitare l’infezione di CMV eventualmente presente nel campione clinico. Dopo la centrifugazione si aggiunge ad ogni pozzetto 1.5 ml di terreno completo MEM e s’incuba a 37°C in un termostato con il 5% CO₂. 24 ore dopo l’inoculo le cellule sono fissate in metanolo-acetone (1:2) per 20 minuti a -20°C. La presenza di CMV viene evidenziata mediante una reazione di immunofluorescenza indiretta, utilizzando un anticorpo monoclonale specifico per la proteina precocissima p72 (E13-Argene, Paris, France).

Tale metodica è usata anche per l’isolamento virale su latte materno, ma in questo caso è necessario un pre-trattamento del campione.

Preparazione del latte materno prima dell’inoculo in colture cellulari.

Due ml di latte materno in toto vengono centrifugati a 3000 rpm per 20 minuti. Questo permette di distinguere tre fasi:

- un pellet cellulare, detto anche “milk cells”
- una zona intermedia detta anche “milk whey”
- un surnatante costituito da grasso.

La zona intermedia viene prelevata, filtrata (utilizzando filtri da 0,2 micron) ed 1 ml del filtrato viene sottoposto ad ultracentrifugazione

(50.000 g, 60 minuti, 4°C). Il pellet viene risospeso in 200 µl di terreno ed utilizzato per l'inoculo.

PCR QUALITATIVA

Il DNA viene estratto da 200 µl di urine o latte materno (“milk whey”) utilizzando le colonnine QIAGEN e risospeso in 50 µl di buffer di eluizione. Alla fase di estrazione segue il processo di amplificazione con una PCR nested che individua il genoma di CMV. In breve, nel primo step 5 µl di DNA vengono aggiunti a 45 µl di miscela di amplificazione così composta: buffer 10X (5 µl), MgCl₂ 25 mM (5 µl), nucleotidi 5mM (8 µl), outer primer (MIEA 4-5) 25 µM (1.5 µl), H₂O sterile bidistillata (23,6 µl), Taq 5U/µl (0.4 µl). Il secondo step prevede l'amplificazione di 1 µl del prodotto del primo step. Chiaramente la miscela di amplificazione conterrà inner primer (MIEA 6-7) in modo da amplificare una regione del genoma interna rispetto a quella amplificata nel primo step.

Il prodotto finale di amplificazione, evidenziabile mediante separazione elettroforetica su gel di agarosio al 2-4%, ha le dimensioni di 110 bp.

PCR QUANTITATIVA COMPETITIVA ESEGUITA IN AUTOMATICO: METODO COBAS AMPLICOR CMV MONITOR.

Il test COBAS AMPLICOR CMV MONITOR è un test di amplificazione in vitro degli acidi nucleici progettato per la ricerca e la determinazione quantitativa del DNA di CMV. Noi lo abbiamo utilizzato per la ricerca del genoma virale nel latte materno e nei leucociti ottenuti da sangue intero. Il test utilizza il principio della

PCR per l'amplificazione delle molecole "target" ed una reazione enzimatico-colorimetrica per la rivelazione delle molecole amplificate. Entrambe le procedure vengono automaticamente eseguite dallo strumento COBAS AMPLICOR, Roche.

Il test è basato su quattro fondamentali processi:

- preparazione del campione
- amplificazione con PCR del DNA bersaglio tramite sequenze primer complementari e specifiche per CMV
- ibridazione dei prodotti amplificati attraverso il legame con sonde oligonucleotidiche complementari ai prodotti amplificati
- rivelazione enzimatico-colorimetrica (lettura fotometrica a $A= 660$ nm) delle molecole che sono state riconosciute nel corso della precedente fase di ibridazione.

La quantificazione del DNA virale si realizza attraverso il metodo dello Standard quantitativo interno. Il test amplifica simultaneamente le molecole target di CMV DNA appartenente al campione in esame e quelle di un "Quantitation Standard DNA" (QS DNA), aggiunte a titolo noto nel corso della fase di preparazione del campione. Il QS è costituito da un trascritto di DNA non infettivo che presenta i medesimi siti di attacco dei primer previsti per la molecola di DNA target di CMV ed una specifica regione di legame per la sonda di ibridazione complementare, che lo distingue dagli amplificati ottenuti dalle molecole target. Una quantità nota di QS viene aggiunto ad ogni singolo campione e ai tre controlli (negativo, basso positivo, alto positivo) e viene trasferito in modo inalterato attraverso le fasi di preparazione, amplificazione, ibridazione e rivelazione, così che standard interno e sequenza bersaglio del genoma di CMV siano sottoposti contemporaneamente alle stesse condizioni di reazione. La concentrazione di CMV DNA di ogni campione viene determinata confrontando l'assorbanza (densità ottica) del

campione amplificato con quella ottenuta dalla rivelazione del QS. Il titolo virale del DNA di CMV, presente in ogni campione, viene espresso adottando come unità di misura le copie/ml.

Per la determinazione quantitativa del carico virale nel sangue, prima si procede alla separazione dei leucociti polimorfonucleati (PMNL) dal sangue periferico.

I PMNL vengono separati da altre cellule del sangue periferico aggiungendo a 5 ml di sangue con EDTA, 1 ml di destano al 6% in soluzione fisiologica. Dopo 20 minuti di incubazione a 37°C si ottiene la formazione di un sovrnatante ricco di PMNL. Si recupera quindi il sovrnatante e lo si addiziona a 10 ml di PBS con l'1% di siero bovino fetale. Le cellule vengono centrifugate a 1000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente. Al termine della centrifugazione il pellet cellulare viene risospeso in 1 ml di cloruro di ammonio allo 0,8% ed incubato per 2 minuti, in modo da ottenere la lisi totale delle emazie presenti. Dopo una nuova centrifugazione a 1000 rpm per 10 minuti il pellet viene risospeso in PBS con 1% di siero bovino fetale. Le cellule vengono a questo punto contate nella camera di Burker e si preparano aliquote da 10^6 PMNL.

Separati i PMNL si procede all'estrazione del DNA; il risultato finale viene espresso come numero di copie/ 100.000 PMNL.

Per la determinazione quantitativa del carico virale nel latte materno, il DNA viene estratto partendo da un'aliquota di 200 μ l di "milk whey" e il risultato finale viene espresso come numero di copie/ ml.

ANTIGENEMIA

Tale metodica indica la quantizzazione dei leucociti polimorfonucleati circolanti che veicolano la fosfoproteina strutturale pp65 di CMV, proteina molto abbondante e dotata di uno spiccato tropismo per il nucleo. Il metodo si basa su quattro passaggi essenziali:

1. separazione dei PMNL del sangue periferico con destrano e preparazione dei vetrini;
2. fissazione e permeabilizzazione dei PMNL;
3. rivelazione con immunofluorescenza;
4. lettura e quantizzazione del risultato.

Il risultato viene espresso come numero di PMNL positivi / 2×10^5 PMNL.

DETERMINAZIONE DEL GENOTIPO VIRALE

Estrazione DNA virale: Le urine neonatali e il latte materno sono stati sottoposti ad estrazione del DNA virale mediante Biosprint 15 QIAquick Blood Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Dopo quantizzazione spettrofotometrica, il DNA ottenuto dai campioni clinici è stato utilizzato per la successiva amplificazione dell'UL73 codificante per gN e genotipizzazione mediante sequenziamento.

Polimerase Chain Reaction (PCR) e sequenziamento. Il DNA virale purificato da reperti clinici è stato amplificato utilizzando il termociclatore PTC200 (MJ-Research Inc., Watertown, MA USA) e sequenziato nelle regioni corrispondenti all'ORF virale UL73.

Il DNA è stato diluito in acqua fino ad ottenere una concentrazione ottimale per essere usato come *template* per la PCR, condotta su circa 300 ng di DNA totale.

L'amplificazione dell'ORF UL73 è stata eseguita utilizzando i *primers* gN-UP (5'-TTCGGTCGGTCAACATCGTAAG-3') e gN-Low (5'-CACCCACGTATGTAAACCTTAC-3'), e le seguenti condizioni di PCR: 35 cicli con denaturazione a 96°C per 1 min, *annealing* a 55°C per 1 min ed *extension* a 72°C per 1 min. Il prodotto di PCR è stato sequenziato presso la ditta Primm, Milano, Italia e le sequenze sono state elaborate mediante il software Megalign Program Package (DNASStar, Lasergene 7.0) che ci ha consentito di assegnare ciascun isolato clinico ad uno dei 7 genotipi gN ritrovabili nei ceppi wild-type.

METODI STATISTICI

L'analisi statistica è stata eseguita mediante SPSS for Windows, release 13.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA); le variabili continue sono state espresse come media \pm deviazione standard; i dati categorici sono stati espressi come numeri (percentuali).

Per l'analisi comparativa delle variabili continue è stato usato il test t Student con il test di Levene o il test di Mann–Whitney U. Le variabili categoriche sono state comparate mediante test chi-quadro di Pearson o Fisher's Exact test. Per l'analisi statistica è stato usato il programma STATA 9.2 (Stata Corporation, College Station, TX). Abbiamo considerato significativo un P value con un livello di significatività del 5% (due code) definito come $P < .05$.

RISULTATI

Dal dicembre 2003 all'agosto 2006 sono stati arruolati 68 madri ed i loro 80 neonati prematuri di EG \leq 32 settimane e PN < 1500 g (VLBW infants) ricoverati subito dopo la nascita presso la nostra UTIN ed alimentati con latte materno per almeno un mese .

La ricerca di anticorpi IgG per CMV eseguita su sangue materno al momento del parto ha evidenziato che 53/68 madri erano sieropositive per CMV (78%) mentre 15 (22%) erano sieronegative. Tale percentuale di sieropositività scende al 71% se valutiamo solo le donne italiane (35/49 sieropositive e 14/49 sieronegative), mentre tra le donne immigrate la sieropositività è risultata pari al 95% (18/19 donne straniere). Le madri negative per anticorpi anti-CMV sono risultate di categoria socio-economica più elevata rispetto alle donne sieropositive; in particolare abbiamo osservato che le donne che lavorano nell'ambito della sanità o della scuola sono più frequentemente sieropositive (7/53 sieropositive vs 0/15 sieronegative). La tabella 1 mostra le caratteristiche anagrafiche e socio-economiche delle madri arruolate nel nostro studio.

Gli 80 bambini VLBW arruolati presentavano EG media di 29.0 ± 2.2 settimane (mediana: 29 settimane; range: 24–32 settimane), PN medio di 1125 ± 277 grammi (mediana: 1165 g; range: 555–1490 grammi). 25/80 bambini (31% della popolazione studiata) era ELBW, cioè con PN < 1000g. 25/80 (31% della popolazione studiata) era SGA, cioè piccolo per l'età gestazionale; 41 erano maschi e 39 femmine. 79/80 bambini studiati sono nati da parto cesareo. Nell'unico caso di parto spontaneo il tampone vaginale eseguito alla madre è risultato negativo per CMV. Tra i bambini valutati vi sono 10 coppie di gemelli, una tripletta e due bambini nati da due gravidanze gemellari con uno dei due feti morto in utero.

Tabella 1: Caratteristiche anagrafiche e socio-economiche delle madri arruolate nello studio.

		Donne sieropositive per CMV (n 53)	Donne sieronegative per CMV (n 15)	P
Età, anni	Range	19-45	29-40	
	Mediana	33	33	
	Media \pm DS	32.3 \pm 5.7	33.6 \pm 3.2	0.402
Origine geografica, n° (%)	Italia	35 (66%)	14 (93.3%)	0.050
	Africa	6 (11.3%)	-	
	Asia	6 (11.3%)	-	
	America	4 (7.5%)	1 (6.6%)	1.000
	Est europa	2 (3.7%)	-	
Scolarità, n° (%)	Elementari	2 (3.7%)	-	
	Medie infer	16 (30.1%)	2 (13.3%)	0.320
	Medie super	23 (43.3%)	5 (33.3%)	0.562
	Laurea	12 (22.6%)	8 (53.3%)	0.028
Occupazione, n° (%)	Casalinga	11 (20.7%)	-	
	Dipendente	33 (62.2%)	11 (73.3%)	0.547
	Libero professionista	8 (15.0%)	4 (26.6%)	0.441
	Altro	1 (1.8%)	-	
Altri figli, n° (%)	Si	20 (37.7%)	2 (13.3%)	0.117

Nel latte materno delle 15 madri CMV negative non è stato isolato il virus o evidenziato il DNA in nessun campione esaminato (isolamento virale e PCR qualitativa), né si è verificata la trasmissione del CMV ai loro rispettivi 18 bambini.

Nel gruppo delle madri sieropositive il CMV è stato isolato nel latte di 21/53 madri (40% delle madri CMV positive e 31% della popolazione materna totale).

Il latte materno è risultato positivo all'isolamento in solo un campione in 10 casi, mentre nelle restanti 11 madri la positività si è riconfermata in più di un campione raccolto (range: 2-6 campioni). La prima positività del latte materno all'isolamento del CMV (virolactia) è stata riscontrata in media a 22 ± 7 giorni dal parto (mediana: 20.5; range: 14–35 giorni). La persistenza del virus nel latte è stata riscontrata fino a 12 settimane post-partum.

Nei campioni di latte CMV positivo di 15 delle 21 donne è stata eseguita anche la PCR quantitativa: in tutti i casi il latte materno è risultato positivo alla PCR sin dal primo campione prelevato in tutte le donne (entro 7 giorni post-partum).

I campioni di latte di 7 donne sieropositive per CMV ripetutamente negative all'isolamento virale nel latte materno, sono stati valutati anche con metodica PCR quantitativa: in 2/7 (28%) donne la carica virale è risultata inferiore al cut off (< 940 GE/ml) in tutti i campioni di latte materno esaminati, a testimonianza della mancata eliminazione sia di particelle virali vitali sia di frammenti di DNA.

Nei casi esaminati non abbiamo osservato associazioni significative tra entità della carica virale e la positività dell'isolamento del virus nel latte materno o la sua trasmissione al bambino.

Nessuna delle 15 madri sieronegative e nessuna delle 32 madri sieropositive ma senza escrezione del CMV nel latte materno ha trasmesso l'infezione al proprio bambino (Figura 6).

La diagnosi di infezione post-natale da CMV è stata fatta sulla base della positivizzazione delle urine sia all'isolamento virale che alla PCR qualitativa per CMV rispetto ai campioni precedenti di urine che erano risultati negativi ad entrambe le metodiche. In generale su tutti i campioni di urine di tutti gli 80 bambini arruolati nello studio vi è stata la completa corrispondenza tra isolamento e PCR qualitativa.

L'infezione post-natale da CMV è stata riscontrata in 9 bambini che rappresentano l'11% della popolazione di prematuri studiata, il 14.5% dei nati da madre sieropositiva ed il 35% dei bambini che avevano assunto latte infetto.

Nei 9 casi di infezione post-natale da CMV abbiamo eseguito la tipizzazione del genotipo gN nel latte materno e nelle urine del bambino: in tutti i 9 casi abbiamo riscontrato lo stesso genotipo nella madre e nel bambino a conferma della trasmissione del CMV attraverso il latte materno. L'estrema variabilità dei ceppi identificati (gN-3a: 3 casi, gN-1: 3 casi, gN-4c: 3 casi) dimostra che il genotipo non influenza la trasmissione via latte né l'infezione sintomatica/asintomatica nel bambino. Inoltre nella stessa donna è possibile ritrovare più di un ceppo virale. Infatti nei campioni di urine di due gemelli sono stati ripetutamente evidenziati due genotipi diversi: in un gemello abbiamo trovato il ceppo gN-4c e nell'altro gemello il ceppo gN-1; l'analisi del latte materno ha mostrato la presenza di entrambi i genotipi virali in tutti i campioni prelevati.

L'inizio della virolactia nelle madri che hanno trasmesso il virus al proprio bimbo è stato registrato tra 14 e 30 giorni post-partum (mediana: 15 giorni; media \pm DS: 19 ± 7 giorni). L'infezione

nel bambino è stata diagnosticata tra 36 e 92 giorni di vita (mediana: 51 giorni; media \pm DS: 56 \pm 17 giorni) corrispondenti ad una età post-concezionale compresa tra 31 e 43 settimane (mediana: 36 settimane; media \pm DS: 37 \pm 3 settimane). Le caratteristiche dei neonati infetti, del latte materno ad essi relativo e dell'infezione da CMV diagnosticata nelle urine sono elencate in tabella 2.

L'infezione è stata clinicamente sintomatica in 3 casi e clinicamente asintomatica nei restanti 6 casi. Nessuno dei bambini infetti è stato sottoposto a terapia con ganciclovir e tutti hanno avuto una rapida remissione spontanea della sintomatologia.

In un caso (L.I.) l'infezione si è manifestata con sintomi clinici comparsi all'improvviso mentre il bimbo era già stabile e prossimo alla dimissione: il suo peso era di 2040 g e l'età post-concezionale era di 34 settimane. Sono state registrate crisi di desaturazione non associate ai pasti e difficoltà alimentari; inoltre il piccolo mostrava un quadro di malperfusionazione cutanea associata a tachipnea con modesti rientramenti costo-diaframmatici. Tale sintomatologia clinica si è risolta spontaneamente in 24 ore in cui il piccolo ha necessitato di ossigenoterapia in modo non continuativo: questo bambino era già ossigeno-dipendente a 30 giorni di vita ed al momento dell'infezione era soggetto ad una supplementazione di ossigeno solo durante i pasti. Gli esami ematochimici eseguiti nella stessa giornata sono risultati negativi per infezione batterica ma evidenziavano la presenza di lieve neutropenia (1420 neutrofili/mmc) che persisteva imm modificata al controllo successivo eseguito dopo 15 giorni; inoltre si riscontrava un aumento patologico della bilirubinemia diretta (bilirubinemia totale: 9.5 mg/dl, diretta: 8.68 mg/dl). L'isolamento del CMV nelle urine risultava positivo per la prima volta nel campione prelevato nella giornata in cui è comparsa la sintomatologia clinica; il campione negativo precedente risaliva a sette giorni prima.

Un'altra bambina (R.I.) nata a 25 settimane di EG al momento dell'infezione avvenuta a 63 giorni di vita presentava un quadro clinico-radiologico di broncodisplasia. L'infezione si è manifestata clinicamente con la comparsa di ripetute crisi di desaturazione non associate ad altri segni clinici ma ad anomalie laboratoristiche (marcata neutropenia: 540 neutrofili/mmc, seguita dopo 4 giorni dall'infezione da piastrinopenia: 41.000/mmc). La bimba non ha necessitato di un supporto respiratorio più intensivo ed ha continuato la supplementazione di ossigeno a flusso libero in termoculla per circa una settimana.

La terza bambina (A.E.) nata anch'essa a 25 settimane di EG ed ossigeno-dipendente, al momento dell'infezione ha presentato alcune crisi di desaturazione associate a bradicardia, risoltesi entro 48 ore senza necessità di un aumento nel supporto respiratorio (ha continuato la supplementazione di ossigeno mediante nasocannule per altri 18 giorni). Al momento dell'infezione è stata documentata una neutropenia moderata (1151 neutrofili/mmc).

I rimanenti 6 bambini infetti non hanno mostrato segni clinici in concomitanza della documentata infezione o nei 10 giorni precedenti e successivi. Cinque di essi, però, hanno mostrato anomalie negli esami di laboratorio: in due casi è stata documentata una neutropenia associata ad iperbilirubinemia diretta (rispettivamente neutrofili: 1456/mmc, bilirubinemia totale: 10 mg/dl, diretta: 9.27 mg/dl; neutrofili: 947/mmc, bilirubinemia totale: 8.9 mg/dl, diretta: 8.1 mg/dl) e in 3 casi è stata evidenziata solo una neutropenia moderata (rispettivamente 1324-1100-1143 neutrofili/mmc).

Il riscontro di neutropenia è risultato strettamente correlato all'infezione da CMV (8 casi/9 infetti vs 17 casi/53 non infetti, $P < .005$) come pure l'iperbilirubinemia diretta (3 casi/9 infetti vs 2 casi/53 non infetti, $P < .05$, tabella 6). Il grado di neutropenia non è risultato diverso nei due gruppi di bambini (infetti e non).

Nessuno degli infetti ha mostrato alterazioni nei valori delle transaminasi o negli indici di flogosi, né sono state registrate anomalie della funzione uditiva valutata mediante ABR in concomitanza con l'avvenuta infezione.

Tabella 2: Caratteristiche dei bambini con infezione post-natale da CMV.

Dati alla nascita				Latte materno		Epoca infezione post-natale	
caso	sexo	EG (sett)	PN (gr)	Isolamento pos (gg vita)	valore max carica virale (GE/ml)	gg di vita	Età post -concezionale (sett)
VL	M	31	1450	15	$1,03 \times 10^5$	71	41
LI	M gem	28	1340	16	$3,82 \times 10^4$	45	34
LD	M gem	28	710			58	36
PM	F	31	1180	15	$1,3 \times 10^3$	36	36
DPG	F	30	1355	30	$9,16 \times 10^4$	92	43
SS	F gem	32	1045	15	$8,50 \times 10^4$	51	39
SJ	F gem	32	1160			51	39
AE	F	25	810	30	$2,24 \times 10^4$	42	31
RI	F	25	800	14	-	63	34

Nei due gruppi di bambini nati da madri sieropositive per CMV (infetti e non) l'analisi dei dati alla nascita non ha evidenziato differenze statisticamente significative (tabella 3). Analogamente i due gruppi di bambini non hanno presentato differenze statisticamente significative nella morbilità manifestatasi durante il ricovero (assistenza respiratoria, infezioni, necessità di trasfusioni di emocomponenti; tabella 4) o negli esiti a breve termine valutati alla dimissione (emorragia cerebrale/leucomalacia periventricolare, retinopatia della prematurità, enterocolite necrotizzante,

ossigenodipendenza a 30 giorni di vita e a 36 settimane di EG o broncodisplasia, durata del ricovero, EG e PN alla dimissione; tabella 5).

L'EG \leq 28 settimane e il PN $<$ 1000 gr non si sono dimostrati dei fattori di rischio significativi di infezione (EG \leq 28 settimane: 22/53 non infetti vs 4/9 infetti P = 1.000; PN $<$ 1000 gr: 18/53 non infetti vs 3/9 infetti P = 0.752). Invece la somministrazione alla nascita di emoderivati quali plasma da aferesi o immunoglobuline endovena arricchite in IgM (IVIG) allo scopo di trattare una sospetta o accertata infezione del neonato di bassa EG (EG \leq 28 settimane) si è rivelato un fattore protettivo contro l'infezione post-natale da CMV (1 caso di somministrazione di emoderivati/4 infetti di EG \leq 28 sett vs 18 casi di somministrazione di emoderivati/20 non infetti di EG \leq 28 sett, P $<$.05).

L'EG \leq 28 settimane si è rivelato un fattore di rischio per l'infezione clinicamente sintomatica: infatti tutti i 3 bambini sintomatici erano di EG \leq 28 settimane, mentre solo 1/5 degli asintomatici era EG \leq 28 settimane, P $<$.05). Anche la broncodisplasia, intesa come ossigeno -dipendenza sia a 30 giorni di vita che a 36 settimane post-concezionali ha mostrato una stretta correlazione con l'infezione sintomatica (ossigenodipendenza a 30 giorni di vita e a 36 settimane di EG: 3/3 infetti sintomatici vs 0/6 infetti asintomatici, P $<$.05).

I 9 bambini infettati sono stati seguiti in follow up fino all'età di 2 anni (6 bambini) e 3 anni (3 bambini). A tutti i controlli eseguiti non sono state evidenziate anomalie nella funzione uditiva, visiva, negli esami di neuroimaging e nello sviluppo psico-motorio.

Tabella 3: Caratteristiche alla nascita dei bambini nati da madri sieropositive

	Nati da madri sieropositive (n=62)		
	Non infetti (n=53)	Infetti (n=9)	P value
EG, settimane, media \pm SD	28.6 \pm 1.9	29.4 \pm 3.0	0.290
EG \leq 28 settimane, n° bambini (%)	20 (37.7)	4 (44.4)	0.724
PN, gr, media \pm SD	1106 \pm 287	1094 \pm 270	0.907
ELBW, n° bambini (%)	18 (33.9)	3 (33.3)	1.000
SGA, n° bambini (%)	13 (24.5)	5 (55.5)	0.106
Maschi, n° bambini (%)	27 (50.9)	3 (33.3)	0.475
Taglio cesareo, n° bambini (%)	53 (100)	8 (88.8)	0.145

EG: età gestazionale; PN: peso neonatale; ELBW: extremely low birth weight (PN < 1000 gr); SGA: small for gestational age.

Tabella 4: Morbilità, grado di assistenza intensiva, necessità di emoderivati dei bambini nati da madri sieropositive.

	Nati da madri sieropositive (n=62)		
	Non infetti (n=53)	Infetti (n=9)	P value
PDA, n° bambini (%)	29 (54.7)	3 (33.3)	0.294
Surfattante, n° bambini (%)	30 (56.6)	3 (33.3)	0.283
VM, n° bambini (%)	20 (37.7)	2 (22.2)	0.471
VM, giorni, media \pm SD	8.2 \pm 8.8	3.5 \pm 2.1	0.118
nCPAP, n° bambini (%)	46 (86.7)	6 (66.6)	0.150
nCPAP, giorni, media \pm SD	11.4 \pm 12.2	10.2 \pm 8.6	0.778
Infezioni nosocomiali, n° bambini (%)	6 (11.3)	1 (11.1)	1.000
IVIG e/o plasma da aferesi, n° bambini (%)	23 (43.3)	2 (22.2)	0.291
Globuli rossi concentrati, n° bambini (%)	29 (54.7)	4 (44.4)	0.722
n° trasfusioni GRC/bambino, media \pm SD	2.1 \pm 2.8	1.1 \pm 1.6	0.303
Concentrato piastrinico, n° bambini (%)	2 (3.7)	0	1.000

PDA: persistenza del dotto di Botallo; VM: ventilazione meccanica; nCPAP: nasal Continuous Positive Airways Pressure; IVIG: immunoglobuline endovena arricchite in IgM; GRC: globuli rossi concentrati.

Tabella 5: Esiti alla dimissione dei bambini nati da madri sieropositive

	Nati da madri sieropositive (n=62)		
	Non infetti (n=53)	Infetti (n=9)	P value
IVH/PVL, n° bambini (%)	2 (3.7)	0	1.000
Ventricolomegalia (5-10mm), n° bamb (%)	6 (11.3)	1 (11.1)	0.327
ROP 1-2° grado, n° bambini (%)	5 (9.4)	1 (11.1)	1.000
NEC \geq 2° stadio, n° bambini (%)	2 (3.7)	0	1.000
O2dipendenza a 30 gg, n° bambini (%)	21 (39.6)	3 (33.3)	1.000
O2dipendenza a EG 36 sett, n° bambini (%)	14 (26.4)	3 (33.3)	0.695
Durata O2 terapia, giorni, media \pm SD	34.2 \pm 32.7	37.2 \pm 25.9	0.795
Durata ricovero, giorni, media \pm SD	57.0 \pm 30.6	52.3 \pm 18.3	0.657
Decesso, n° bambini (%)	0	0	-
EG alla dimissione, media \pm SD	36.5 \pm 3.3	36.5 \pm 0.8	1.000
PN alla dimissione, media \pm SD	2078 \pm 481	1985 \pm 211	0.572

IVH: emorragia cerebrale; PLV: leucomalacia periventricolare; ROP: retinopatia della prematurità; NEC: enterocolite necrotizzante; EG: età gestazionale; PN: peso neonatale.

Tabella 6: Valori ematochimici patologici dei bambini nati da madri sieropositive.

	Nati da madri sieropositive (n=62)		
	Non infetti (n=53)	Infetti (n=9)	P value
Neutropenia, n° bambini (%)	17 (32.0)	8 (88.8)	0.002
Neutropenia, valore assoluto, media \pm SD	1080 \pm 224	1116 \pm 279	0.752
Piastrinopenia, n° bambini (%)	5 (9.4)	1 (11.1)	1.000
Iperbilirubinemia diretta, n° bambini (%)	2 (3.7)	3 (33.3)	0.018
RCP > 1.0 mg/dl, n° bambini (%)	5 (9.4)	0	1.000

Neutropenia: < 1500/mmc; piastrinopenia: < 100.000/mmc; iperbilirubinemia diretta: > 8 mg/dl; RCP: proteina C reattiva.

Tabella 7: Fattori di rischio per infezione post-natale da CMV clinicamente sintomatica.

	Infezione post-natale da CMV (n=9)		
	sintomatici (n=3)	asintomatici (n=6)	P value
EG ≤ 28 settimane, n° bambini (%)	3	1	0.047
EG > 28 settimane, n° bambini (%)	0	5	
PN < 1000 gr, n° bambini (%)	2	1	0.226
PN ≥ 1000 gr, n° bambini (%)	1	5	
O2- dipendenza *, n° bambini (%)	3	0	0.011
Non O2-dipendenza *, n° bambini (%)	0	6	
IVIG e/o plasma da aferesi, n° bambini (%)	1	0	0.333
Non IVIG e/o plasma da aferesi, n° bambini (%)	2	6	

*: ossigeno-dipendenza presente a 30 giorni di vita, al momento dell'infezione ed in seguito a 36 settimane di EG .

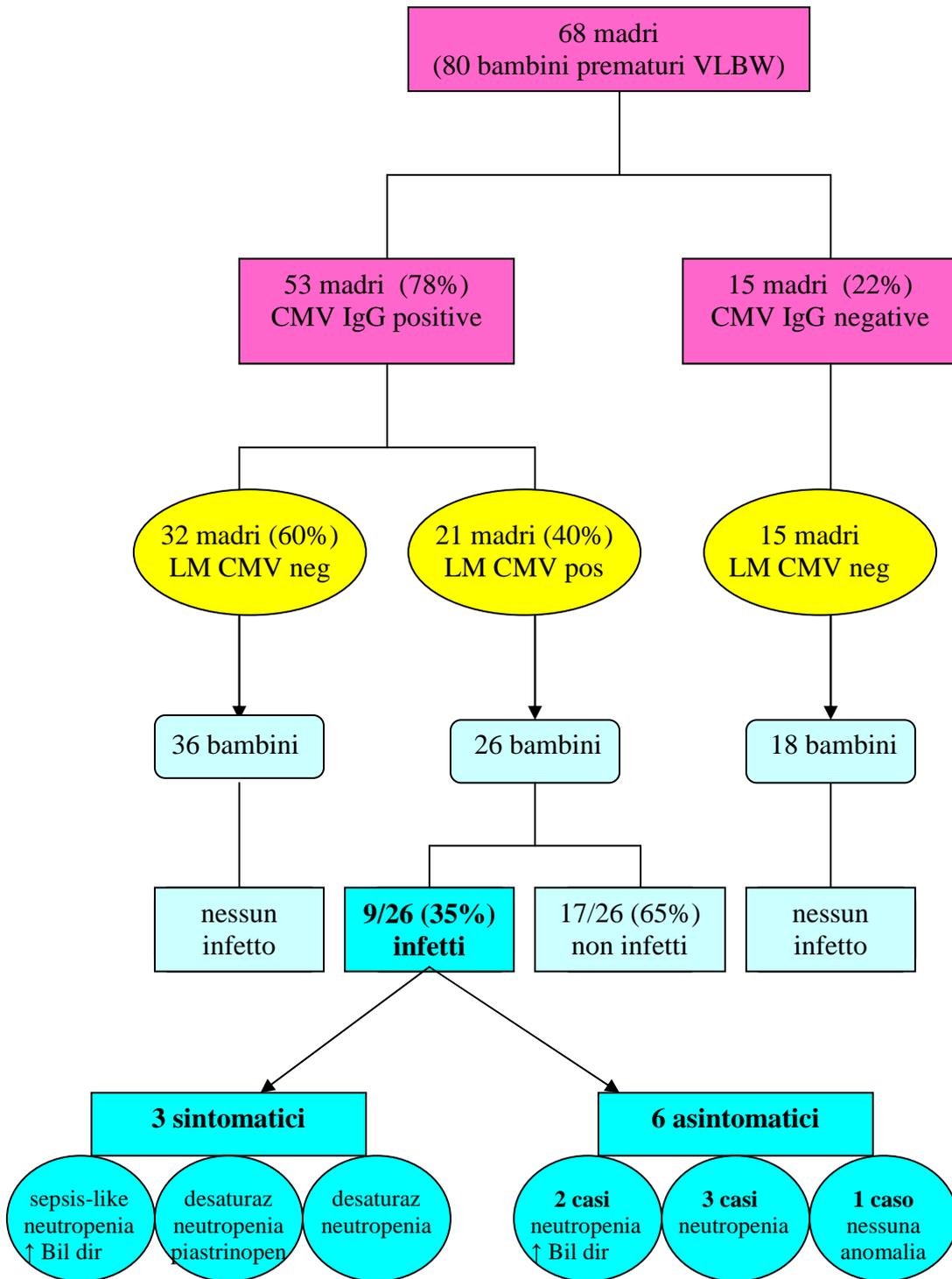


Figura 6: Risultati dello studio.

DISCUSSIONE

Il latte materno è considerato il principale veicolo della trasmissione del CMV in epoca post-natale. L'infezione generalmente non comporta alcun pericolo nel neonato a termine, mentre nel prematuro sono stati segnalati casi sporadici e riscontri su casistica numerosa di problemi neonatali importanti (neutropenia, trombocitopenia, sindrome sepsis-like, epatopatia, disturbi neurologici, enterocolite necrotizzante, polmonite interstiziale).

La categoria di prematuri a rischio è rappresentata dai nati da madre sieropositiva per CMV. Tale condizione sierologica depone per un'infezione pregressa con persistenza del virus nell'organismo allo stato latente; durante l'allattamento può verificarsi la riattivazione virale nella ghiandola mammaria con eliminazione del CMV nel latte materno secondo un meccanismo ancora sconosciuto.

Nel nostro studio le donne IgG positive per CMV (di cui 19 straniere) al momento del parto sono risultate pari all'78%, mentre tra le donne italiane la sieropositività è risultata pari al 71%: tale dato concorda con il tasso di sieroprevalenza della popolazione italiana adulta che è pari al 70%. Inoltre, come già evidenziato in altri paesi industrializzati, il livello socio-economico più alto è strettamente associato allo stato di sieronegatività.

Tra le madri sieropositive per CMV il 40% ha eliminato il virus con capacità infettante nel latte materno. Apparentemente questo dato sembra non corrispondere a quanto riportato in letteratura dove il tasso di donne sieropositive con presenza di CMV nel latte è pressoché sovrapponibile alla sieroprevalenza della popolazione adulta e perciò decisamente più elevato^{14,15,22,23}. In realtà gli studi condotti precedentemente hanno valutato la presenza del CMV nel latte materno anche mediante PCR, mentre noi

abbiamo considerato solo l'isolamento virale in quanto in grado di indicare la presenza del virus con capacità infettante.

Il nostro dato sulla coltura virale, comunque, è simile a quello già riscontrato in letteratura. Infatti se andiamo a valutare la positività del latte materno nello studio di Hamprecht et al.^{22,23}, osserviamo che 73/76 donne IgG positive presentavano il DNA, mentre 27/76 (35%) producevano latte risultato positivo anche per l'isolamento virale.

Sebbene i casi esaminati siano pochi, l'esame PCR nel latte materno risulta positivo più spesso e più precocemente rispetto all'isolamento virale, come già evidenziato in altri studi: tale sensibilità, però, può essere aspecifica. Infatti i nostri dati evidenziano che l'infezione post-natale da CMV nei pretermine alimentati con latte materno si sviluppa solo se il latte contiene particelle virali infettanti, evidenziabili mediante isolamento colturale.

In letteratura il tasso di trasmissione del virus ai bambini alimentati con latte materno CMV-positivo varia dal 10% al 76%^{14,15,22-24, 49}. Nel nostro studio il tasso di trasmissione è risultato pari al 35% avendo riscontrato l'infezione post-natale in 9 dei 26 pretermine nati da madri sieropositive che eliminavano il virus infettante nel latte.

Se consideriamo le donne sieropositive (che, in base ad altri studi nella quasi totalità dovrebbero eliminare DNA virale nel latte materno) il tasso di trasmissione si abbassa al 14.5% (9 infetti su 62 nati da donne CMV sieropositive).

In caso di latte materno CMV DNA positivo il tasso di trasmissione dell'infezione al bambino è risultato del 10% per Yasuda et al.²⁴, del 25% per Mosca et al.⁴⁹, del 38% per Hamprecht et al.^{22,23}, mentre se ricaviamo il tasso di infezione dei prematuri nati da madri sieropositive, questo è pari al 37% per Hamprecht et

al.^{22,23}, all' 8.8% per Yasuda et al.²⁴, al 6% per Mosca et al.⁴⁹, al 15% per Wai-Tim Jim et al.²⁵, al 5.7% per Miron et al.²⁸ e al 6.2% per Doctor et al.²⁷.

Questa notevole discrepanza tra i diversi tassi di infezione può essere spiegata dal metodo adottato per la conservazione del latte materno. Infatti, mentre lo studio di Hamprecht prevede l'impiego di latte esclusivamente refrigerato a 4-10°C per un massimo di 12 ore, nel nostro centro, quando la produzione di latte materno diviene insufficiente, viene utilizzato il latte della stessa donna che è stato estratto in precedenza e congelato a -20°C. Anche nello studio di Mosca, in quello di Lim ed in quello di Yasuda et al. è previsto l'utilizzo di latte congelato a -20°C. Come riportato in letteratura il congelamento altera la struttura del CMV e quindi ne riduce il potere infettante, inoltre riduce la carica virale, pur non eliminando completamente il virus^{39,41-44}. Ciò può giustificare il più basso tasso di trasmissione nei centri dove il latte materno viene somministrato dopo essere stato conservato mediante congelamento.

Come mostrato in figura 6, 8/9 bambini infetti hanno presentato sintomi clinici o segni laboratoristici di malattia. In 3 casi l'infezione si è manifestata clinicamente con il peggioramento della funzione respiratoria associato ad anomalie laboratoristiche, mentre nei 5 casi restanti si sono evidenziate solo anomalie di laboratorio. In 8 casi abbiamo riscontrato neutropenia, in 3 casi iperbilirubinemia diretta e in un caso piastrinopenia. In particolare valutando i bambini nati da madri sieropositive, distinti in due gruppi (infetti e no) la presenza di neutropenia (non giustificata da altri motivi clinici) è risultata significativamente indicativa di infezione post-natale da CMV, come pure l'iperbilirubinemia diretta. In tutti casi di neutropenia non sono stati riscontrati episodi di infezioni batteriche.

L'EG \leq 28 settimane e il PN $<$ 1000 gr non si sono dimostrati dei fattori di rischio significativi di infezione. Invece la somministrazione alla nascita di emoderivati (plasma da aferesi o immunoglobuline endovena arricchite in IgM) si è rivelato un fattore protettivo contro l'infezione post-natale da CMV in prematuri nati ad EG \leq 28 settimane. Infatti a questa età gestazionale ancora non c'è stato un consistente passaggio di anticorpi materni attraverso la placenta e questo potrebbe essere causa della maggiore suscettibilità del prematuro all'infezione post-natale da CMV. Il plasma da aferesi che viene utilizzato nei nostri prematuri è ottenuto da donatore unico, ma i donatori che afferiscono al nostro Servizio Trasfusionale sono sieropositivi per CMV in oltre il 95% dei casi; le IVIG, invece, sono ottenute da un pool di donatori e pertanto contengono un alto titolo di anticorpi anti-CMV immunologicamente attivi. Pertanto tali emoderivati possono proteggere i prematuri più piccoli dall'infezione da CMV, o almeno a ritardare il momento dell'infezione a quando le condizioni cliniche del piccolo sono oramai stabili. Infatti in un solo caso dei 9 infetti era stato somministrato plasma alla nascita, e la bambina, nata ad EG di 25 settimane, si è infettata a 63 giorni di vita, quando le sue condizioni cliniche erano stabili anche se persisteva un quadro clinico-radiologico di broncodisplasia.

L'EG \leq 28 settimane e la presenza di ossigeno-dipendenza si sono rivelati fattori di rischio per l'infezione clinicamente sintomatica. In particolare in altri studi era stato riportato che i bambini con infezione post-natale precoce (età $<$ 6 settimane) presentavano ossigeno-dipendenza più protratta rispetto ai non infetti. Nel nostro studio, invece, tutti i bambini che erano ancora ossigeno-dipendenti al momento dell'infezione hanno manifestato evidente sintomatologia clinica: in particolare si è assistito al

deterioramento della funzione respiratoria con ricomparsa di crisi di desaturazione, sebbene per un breve periodo (24-48 ore) e con risoluzione spontanea. In ogni caso i bambini infettati non hanno presentato una maggiore incidenza di broncodisplasia rispetto ai non infetti. I 3 bambini sintomatici presentavano ossigeno-dipendenza a 30 giorni di vita (in precedenza al momento dell'infezione) e a 36 settimane di EG (successivamente all'infezione), mentre a 30 giorni di vita nessuno degli asintomatici aveva ancora necessità di supplementazione di ossigeno.

I bambini con infezione post-natale da CMV non hanno presentato una maggiore incidenza di esiti a distanza a breve o lungo termine, né sono state evidenziate anomalie nella funzione uditiva, visiva, negli esami di neuroimaging e nello sviluppo psicomotorio al follow up post-dimissione.

Il neonato VLBW nato da madre sieropositiva per CMV è a rischio di contrarre l'infezione post-natale se alimentato con latte materno. Pertanto è necessario conoscere lo stato sierologico della madre al parto ed eseguire indagini appropriate per stabilire una eventuale infezione acquisita in caso di sintomatologia non giustificata da altre cause.

Sebbene la numerosità della casistica del nostro studio sia piccola e non permetta di escludere complicanze rare ma potenzialmente gravi conseguenti all'infezione post-natale da CMV, nel nostro centro l'infezione non ha mai determinato importanti ripercussioni sullo stato di salute dei bambini prematuri.

I nostri dati suggeriscono che l'infezione da CMV trasmessa al prematuro attraverso il latte materno è sempre asintomatica nel bambino che ha raggiunto la stabilità delle condizioni cliniche e non ha morbilità in atto, mentre può peggiorare il decorso clinico di situazioni patologiche pre-esistenti come la broncodisplasia.

In caso di prematurità estrema, può essere utile la somministrazione immunoglobuline endovena alla nascita come misura di prevenzione dell'infezione. Laddove le condizioni cliniche siano instabili o vi sia una severa patologia cronica in atto, può essere indicato somministrare il latte materno congelato a -20°C per oltre tre giorni.

In generale, considerando gli innumerevoli vantaggi offerti dal latte materno a questa categoria di neonati sia sul piano nutrizionale che psicologico, non riteniamo opportuno in caso di parto pretermine né controindicare l'allattamento materno né trattare con la pastorizzazione il latte di tutte le madri di prematuri sieropositive per CMV.

BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Stagno S.: Cytomegalovirus. In: Remington J.S., Klein J.O.: *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 5th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 2001: 389-424.
- ² Levinsohn E.M., Foy H.M., Kenny G.E.: Isolation of cytomegalovirus from a cohort of 100 infants throughout the first year of life. *Proc Soc Exp Biol Med* 1969; 132: 957-963.
- ³ Numazaki Y., Yano N., Morizuka T.: Primary infection with human cytomegalovirus: virus isolation from healthy infants and pregnant women. *American Journal of Epidemiology* 1970; 91: 410-414.
- ⁴ Demmler GJ. Congenital cytomegalovirus infection and disease. *Adv Pediatr Infect Dis* 1996; **11**: 135-162.
- ⁵ Bale JF, Miner L, Petheram SJ. Congenital cytomegalovirus infection. *Curr Treat Options Neurol* 2002; **4**(3): 225-230.
- ⁶ Noyola DE, Demmler GJ, Nelson CT, *et al.* Houston congenital CMV longitudinal study group. Early predictors of neurodevelopmental outcome in symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr*. 2001; **138**(3): 325-331.
- ⁷ Pass RF, Stagno S, Myers GJ, Alford CA. Outcome of symptomatic congenital cytomegalovirus infection: results of long-term longitudinal follow-up. *Pediatrics* 1980; **66**(5): 758-762.
- ⁸ Fowler KB, Dahle AJ, Boppana SB, Pass RF. Newborn hearing screening: will children with hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection be missed? *J Pediatr*. 1999; **135**(1): 60-64.

⁹ Boppana SB, Fowler KB, Pass RF, *et al.* Congenital cytomegalovirus infection: association between virus burden in infancy and hearing loss. *J Pediatr* 2005; **146**: 817-823.

¹⁰ Kimberlin DW, Lin CY, Sanchez PJ, *et al.* National Institute of allergy and infectious diseases collaborative antiviral study group. Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *J Pediatr* 2003; **143**(1): 16-25.

¹¹ Reynolds D.W., Stagno S., Hosty T.S.: Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *New England Journal of Medicine* 1973; 289: 1-5.

¹² Diosi P, Babusceac L, Nevinglovschi O, Kun-Stoicu G. Cytomegalovirus infection associated with pregnancy. *Lancet* 1967; **2**(7525): 1063-1066.

¹³ Hayes K, Danks DM, Gibas H, Jack I. Cytomegalovirus in human milk. *N Engl J Med* 1972; **287**: 177-178.

¹⁴ Stagno S, Reynolds DW, Pass RF, Alford CA. Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 1980; **302**: 1073-1076.

¹⁵ Dworsky M, Yow M, Stagno S, Pass RF, Alford C. Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. *Pediatrics* 1983; **72**: 295-299.

¹⁶ Yeager AS, Palumbo PE, Malachowski N, Ariagno RL, Stevenson DK. Sequelae of maternally derived cytomegalovirus infections in premature infants. *J Pediatr* 1983; **102**: 918-922.

¹⁷ Paryani SG, Yeager AS, Hosford-Dunn H, *et al.* Sequelae of acquired cytomegalovirus infection in premature and sick term infants. *J Pediatr* 1985; **107**: 451-456.

-
- ¹⁸ Johnson SJ, Hosford-Dunn H, Paryani S, Yeager A, Malachowski N. Prevalence of sensorineural hearing loss in premature and sick term infants with perinatally acquired cytomegalovirus infection. *Ear Hear* 1986; **7**: 325-327.
- ¹⁹ Richter d., Hampl W., Pohlandt F.: Vertical transmission of cytomegalovirus, most probably by breast milk, to an infant with Wiskott-Aldrich syndrome with fatal outcome. *European Journal of Pediatrics* 1997; **156**: 854-855.
- ²⁰ Stagno S., Brasfield D.M., Brown M.B.: Infant pneumonitis associated with Cytomegalovirus, Chlamydia, Pneumocystis and Ureaplasma: a prospective study. *Pediatrics* 1981; **68**: 322-329.
- ²¹ Ballard R.A., Drew L., Hufnagle K.G., Riedel P.A.: Acquired cytomegalovirus infection in preterm infants. *American Journal Disease Child* 1979;**133**: 482-485.
- ²² Vochem M, Hamprecht K, Jahn G, Speer CP. Transmission of cytomegalovirus to preterm infants through breast milk. *Pediatr Infect Dis J* 1998; **17**: 53-58.
- ²³ Hamprecht K, Maschmann J, Vochem M, Dietz K, Speer CP, Jahn G. Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet* 2001; **357**(9255): 513-518.
- ²⁴ Yasuda A, Kimura H, Hayakawa M, *et al.* Evaluation of cytomegalovirus infections transmitted via breast milk in preterm infants with a real-time polymerase chain reaction assay. *Pediatrics* 2003; **111**: 1333-1336.
- ²⁵ Jim WT, Shu CH, Chiu NC, *et al.* Transmission of cytomegalovirus from mothers to preterm infants by breast milk. *Pediatr Infect Dis J* 2004; **23**: 848-851.

-
- ²⁶ Meier J, Lienicke U, Tschirch E, Kruger DH, Wauer RR, Prosch S. Human cytomegalovirus reactivation during lactation and mother-to-child transmission in preterm infants. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 1318-1324.
- ²⁷ Doctor S, Friedman S, Dunn MS, *et al.* Cytomegalovirus transmission to extremely low-birthweight infants through breast milk. *Acta Paediatr* 2005; **94**: 53-58.
- ²⁸ Miron D, Brosilow S, Felszer K, *et al.* Incidence and clinical manifestations of breast milk-acquired Cytomegalovirus infection in low birth weight infants. *J Perinatol* 2005; **25**: 299-303.
- ²⁹ Gessler P., Bischoff G.A., Wiegand D., Essers B., Bossart W.: Cytomegalovirus-associated necrotizing enterocolitis in a preterm twin after breastfeeding. *Journal of Perinatology* 2004; **24**: 124-126.
- ³⁰ Sann L., Aymard M., Gibert R., Bourgeois J., cottancin G., Bethenod M.: Necrotizing enterocolitis and cytomegalovirus infection. *Nouv Presse Med* 1981; **10**: 2495-2499.
- ³¹ D'Agostino S., Stracca-Pansa V., Drei F., Valli F., Colombo B., Guarise P.: Post-necrotizing enterocolitis stenosis of the colon associated with cytomegalovirus infection. Description of a clinical case. *Pediatrics Medica e Chirurgica* 1988; **10**: 637-639.
- ³² Reyes C., Pereira S., Warden M.J., Sills J.: Cytomegalovirus enteritis in a premature infant. *Journal of Pediatric Surgery* 1997; **32**: 1545-1547.
- ³³ van der Strate BW, Harmsen MC, Schafer P, *et al.* Viral load in breast milk correlates with transmission of human cytomegalovirus to preterm neonates, but lactoferrin concentrations do not. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; **8**: 818-821.

-
- ³⁴ Hamprecht K, Witzel S, Maschmann J, Speer CP, Jahn G. Transmission of cytomegalovirus infection through breast milk in term and preterm infants. The role of cell free milk whey and milk cells. *Adv Exp Med Biol* 2000; **478**: 231-239.
- ³⁵ Sabbaj S, Ghosh MK, Edwards BH, *et al.* Breast milk-derived antigen-specific CD8+ T cells: an extralymphoid effector memory cell population in humans. *J Immunol* 2005; **174**: 2951-2956.
- ³⁶ Vollmer B, Seibold-Weiger K, Schmitz-Salue C, *et al.* Postnatally acquired cytomegalovirus infection via breast milk: effects on hearing and development in preterm infants. *Pediatr Infect Dis J* 2004; **23**: 322-327.
- ³⁷ Neuberger P, Hamprecht K, Vochem M, Maschmann J, Speer CP; Jahn G, Poets CF, Goelz R. Case-control study of symptoms and neonatal outcome of human milk-transmitted cytomegalovirus infection in premature infants. *J Pediatr* 2006; **148**: 326-31.
- ³⁸ Welsh JK, Arsenakis M, Coelen RJ, May JT. Effects of antiviral lipids, heat and freezing on the activity of viruses in human milk. *J Infect Dis* 1979; **140**: 322-328.
- ³⁹ Dworsky M, Stagno S, Pass RF, Cassady G, Alford C. 1982 Persistence of cytomegalovirus in human milk after storage. *J Pediatr* 1982; **101**: 440-443.
- ⁴⁰ Friis H, Andersen HK. Rate of inactivation of cytomegalovirus in raw banked milk during storage at -20 degrees C and pasteurization. *BMJ* 1982; **285**: 1604-1605.
- ⁴¹ Goldblum R.M., Dill C.W., Albrecht T.B., Alford E.S., Garza C., Goldman A.S.: Rapid high-temperature treatment of human milk. *Journal of Pediatrics* 1984; **104** (3): 380-385
- ⁴² Sharland M., Khare M., Bedford-Russel A.: Prevention of postnatal cytomegalovirus infection in preterm infants. *Archives Disease Child Fetal and Neonatal Edition* 2002; **86**: F140-F140. 37

⁴³ Maschmann J., Speer C.P., Jahn G., Hamprecht K.: Inactivation of Cytomegalovirus (CMV) in breast milk. *Pediatric Research* 1999; **45**: 924.

⁴⁴ Hamprecht K., Maschmann J., Muller D., Dietz K., Besenthal I., Goelz R., Middeldorp J.M., Speer C.P., Jahn G.: Cytomegalovirus (CMV) inactivation in breast milk: reassessment of pasteurisation and freeze-thawing. *Pediatric Research* 2004.

⁴⁵ American Academy of Pediatrics. In *Red Book: 2003 Report of the Committee on Infectious Diseases* (26th edn), Pickering LK (ed.). American Academy of Pediatrics: Elk Grove Village, IL; 2003.

⁴⁶ Zwiauer K, Deutsch J, Goriup U, *et al.* Prävention von Muttermilch-medierten CMV-Infektionen bei Frühgeborenen. *Monatsschr Kinderheilkd* 2003; **151**: 1346-1347.

⁴⁷ Bryant P, Morley C, Garland S, Curtis N. Cytomegalovirus transmission from breast milk in premature babies: does it matter? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2002; **87**: F 75-77.

⁴⁸ Lindemann PC, Foshaugen I, Lindemann R. Characteristics of breast milk and serology of women donating breast milk to a milk bank. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004; **89**: F440-F441.

⁴⁹ Mosca F, Pugni L, Barbi M, Binda S. Transmission of cytomegalovirus. *Lancet* 2001; **357**(9270): 1800.