

[www.meyer.it](http://www.meyer.it)



# Diagnosi molecolare delle infezioni virali in età pediatrica

**Maria Moriondo, Clementina Canessa**  
Immunology and Infectious Disease Lab

**Anna Meyer Children's Hospital**  
**University of Florence**  
**ITALY**





Chi siamo

Cosa facciamo

Perché lo facciamo

Come lo facciamo

Chi siamo



**Laboratorio di Immunologia e  
Allergologia (AOU A. Meyer  
Firenze)**

**Prof. Chiara Azzari**



# Cosa facciamo



**Diagnosi molecolare malattie invasive  
(meningiti, sepsi, polmoniti)**

**Diagnosi molecolare di malattie infettive  
(HIV, HCV, HBV)**

**Diagnosi molecolare infezione da Herpes  
virus**

**(CMV, EBV, HHV6-7-8, HSV1-2)**

# Perché lo facciamo



**TRAPIANTI**

**MALATTIE INFETTIVE**

## **IMPORTANZA DEL MONITORAGGIO**

**trapianto = trasmissione di un'infezione virale**

**Rigetto**

**aumento morbilità e  
mortalità**

**immunosoppressione**

**Coinfezioni**

**aumento morbilità e  
mortalità**



## **IL RISCHIO DI INFEZIONE PUO' ESSERE DIVISO IN TRE INTERVALLI DI TEMPO**

- 
- **Fase I Pre-engraftment**
  - **Fase II Post-engraftment**
  - **Fase III Periodo tardivo post-trapianto**

# Fase I Pre-engraftment

(prime 2-4 settimane )

## Fattori di rischio

Neutropenia; alterazione delle barriere cutaneo mucose ( chemio-radio-terapia); accesso vascolare profondo.

## Microrganismi

Batteri	Batteri Gram-negativi : Klebsiella e Pseudomonas aeruginosa; Batteri Gram-positivi (predominanti) Staphylococcus aureus, Streptococcus; Clostridium difficile
Funghi	Candida
Herpesvirus	HSV
Altri virus	BK virus (in relazione di GVHD e ciclofosfamide nel regime di condizionamento)

## Principali sedi di infezione

- Polmone
- Canale intestinale
- Cavo oro faringeo (mucosite grave)

## Fase II Post-engraftment ( secondo e terzo mese )

### Fattori di rischio

- Compromissione funzionale dell'immunità cellulare e umorale
- GVHD (graft versus host disease = malattia del trapianto contro l'ospite) acuta

### Microrganismi

Batteri	Batteri Gram-positivi Batteri Gram-negativi
Funghi	Aspergillus, altre muffe e Pneumocystis jirovecii
Herpesvirus	CMV EBV

### Principali sedi di infezione

- Polmone
- Intestino

## **Fase III Periodo tardivo post-trapianto** (dopo il secondo o terzo mese, $\geq 100$ gg dopo TCSE)

### **Fattori di rischio**

- GVHD cronica
- Deficit funzioni fagocitiche e macrofagiche
- Compromissione immunità cellulare ed umorale

### **Microrganismi**

Batteri	Batteri incapsulati, pneumococco, haemophilus influenzae, Nocardia
Funghi	Aspergillus, altre muffe e Pneumocystis jirovecii
Herpesvirus	CMV e VZV EBV

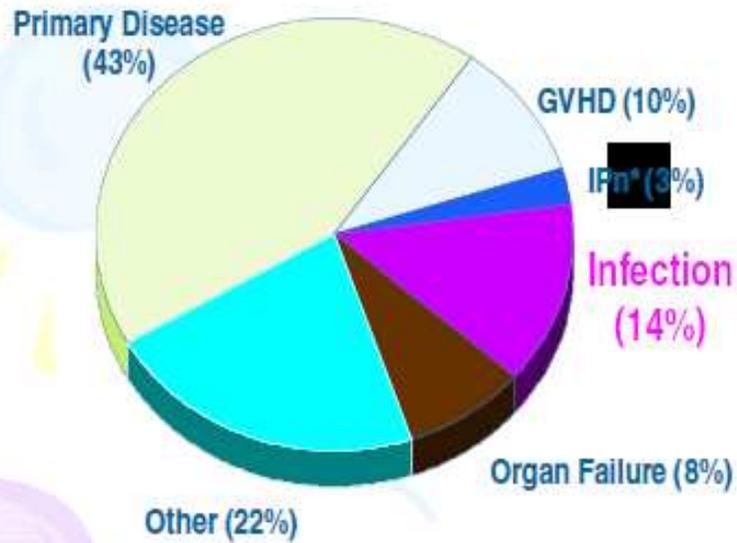
### **Principali Infezioni**

- Cute
- Vie aeree superiori

# IMPATTO DELL'EVENTO INFEZIONI: MORTALITÀ

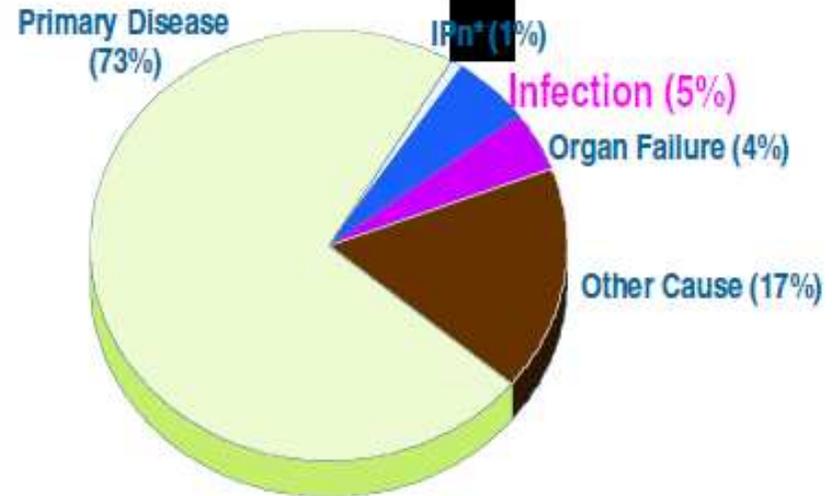
Causes of death after transplantations  
done in 2003-2008

## HLA-identical sibling

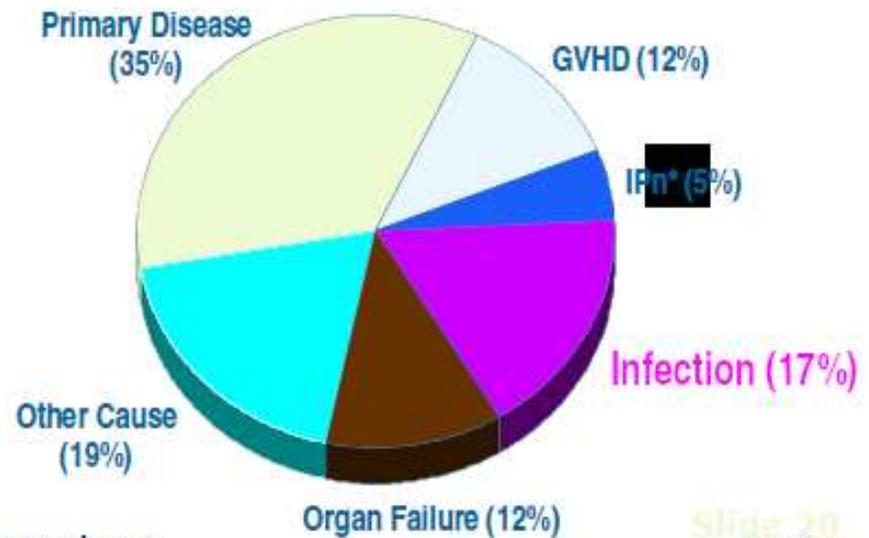


CIBMTR

## Autologous



## Unrelated donor



\*IPn = Idiopathic pneumonia syndrome

# Prevenzione delle infezioni

- ❖ Screening infettivologico pre-trapianto del donatore per determinare il loro stato di salute generale e il rischio per la trasmissione delle infezioni ai destinatari
- ❖ Screening infettivologico pre-trapianto del ricevente
- ❖ Sorveglianza virale di routine (CMV, HSV, EBV, ecc) nei primi 3 mesi dopo il trapianto
- ❖ Chemioprolifassi antibiotica
- ❖ Adozione di protocolli standard per la diagnosi e il trattamento precoce delle infezioni
- ❖ Adozione di pratiche assistenziali basate sull'evidenza scientifica .

# Come lo facciamo



**PCR end-point**

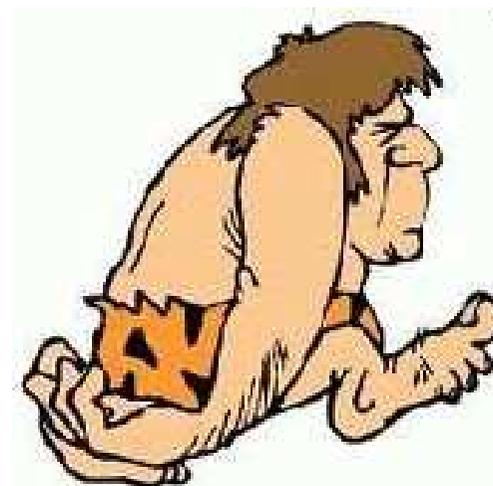


**PCR real-time**



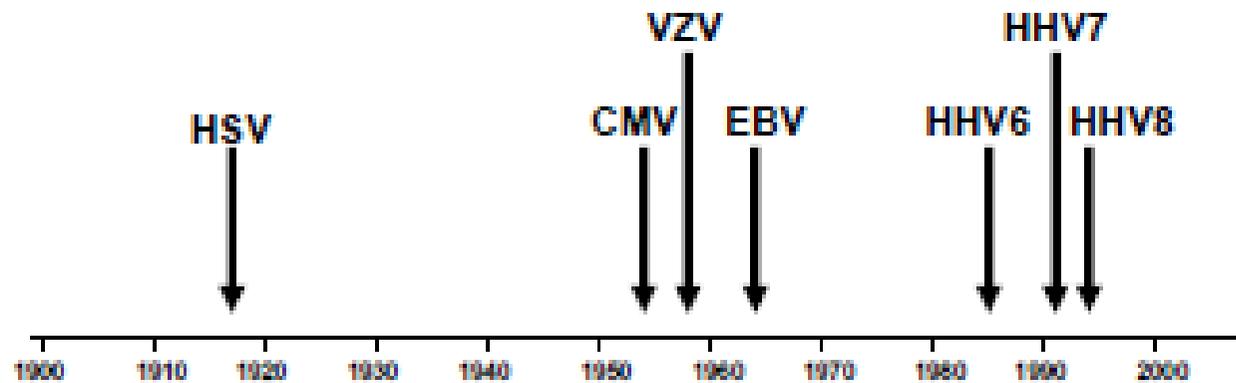
Tutto questo  
dal 2001 in poi.

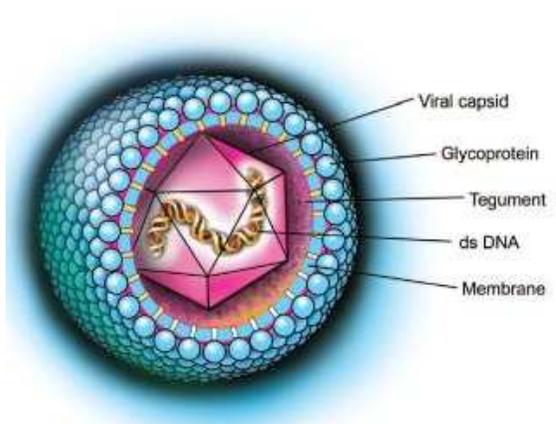
Ma prima del 2001  
???





# SCOPERTA DEGLI HERPESVIRUS





HCMV Human Cytomegalovirus

# CMV



**CMV** è un virus patogeno per l'uomo: infetta circa lo 0.5-2.5% di tutti i neonati e circa il 50% della popolazione adulta nei paesi industrializzati (patologia subclinica).

**CMV** è la causa più comune di difetti congeniti

**CMV** è un patogeno opportunista nei pazienti immunocompromessi (trapiantati, immunodeficienti)

# Test diagnostici (immunodepressi)

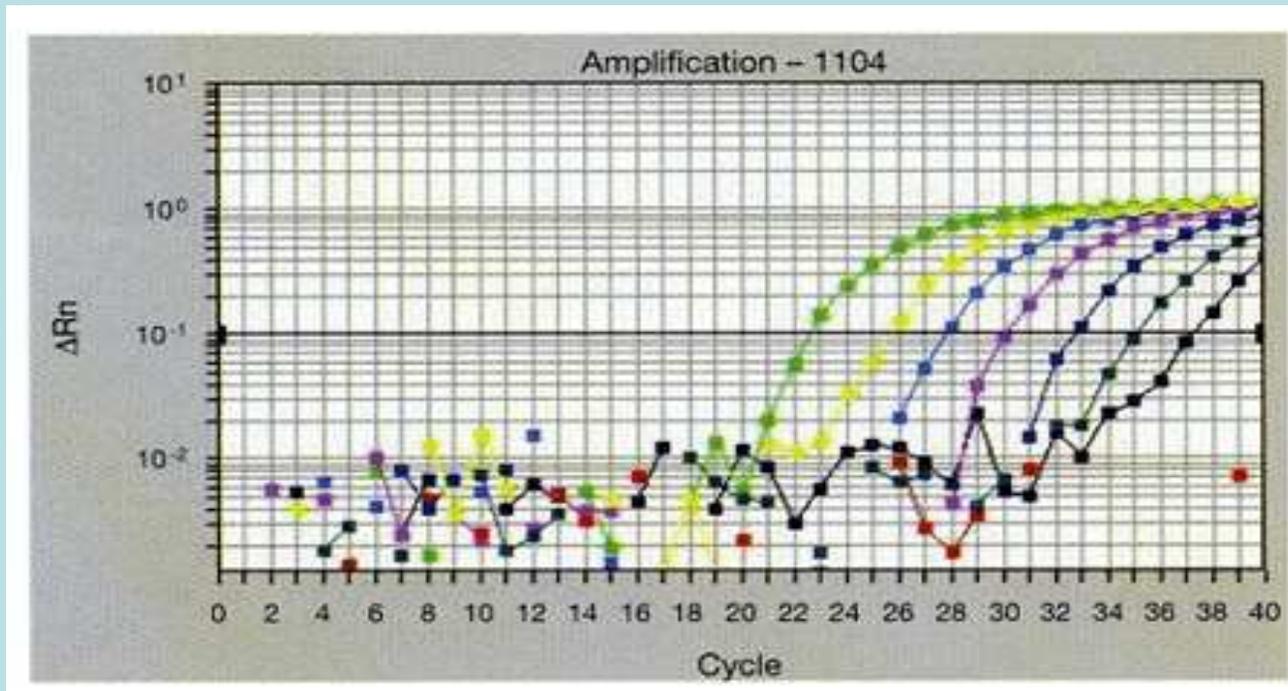


L'esame colturale era considerato il test di riferimento per l'infezione da CMV. Il CMV cresce solo in colture cellulari di fibroblasti diploidi e deve essere coltivato per 4-6 settimane.

Risultati più rapidi inoculando i campioni post centrifugazione su monostrato di fibroblasti in coltura. Risultati dopo 1-2 giorni ricercando antigene precocissimo pp72 in immunofluorescenza.

Ricerca dell'antigene pp65 su neutrofili separati (immunofluorescenza). Basso costo ma a volte non praticabile (assenza di bianchi nei soggetti immunodepressi).

# Test diagnostici



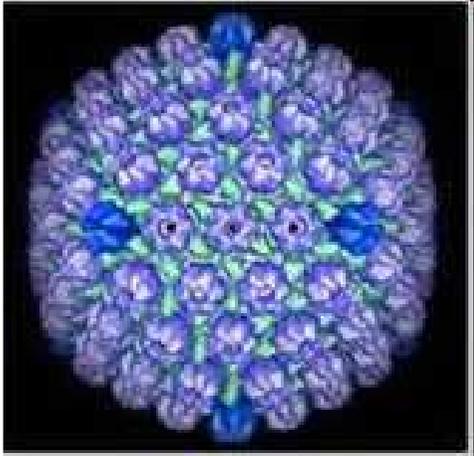
Gold standard attuale: quantificazione di CMV DNA in campioni di sangue intero mediante Real-Time PCR: rapidi riproducibile elevato significato clinico.

Quindi, nei soggetti trapiantati, si è passati dal richiedere la pp65 (tempi 7-10 giorni) **1 volta ogni 15 giorni**



A richiedere PCR CMV qualitativa e quantitativa (tempi **1-2 giorni routine, 2 ore se urgente**) a ogni controllo





# EBV



## Mononucleosi infettiva:

trasmissione attraverso la saliva, contatti stretti (malattia del bacio) o tramite spazzolini, bicchieri contaminati.

## Linfoma di Burkitt:

cofattori malaria, predisposizione genetica.

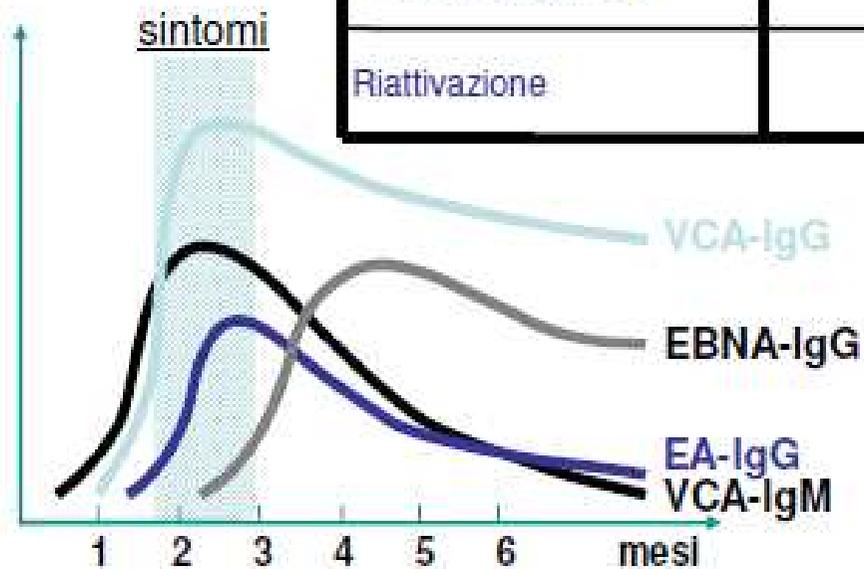
Carcinoma nasofaringeo: predisposizione genetica e alimentazione (Cina).

Leucoplachia orale capelluta: trapiantati e malati di AIDS sono ad alto rischio.

# Test diagnostici



	VCA IgM	VCA IgG	EA IgG	EBNA IgG
Infezione acuta	◆	◆	◆	
Infezione cronica		◆	◆	
Infezione pregressa		◆		◆
Riattivazione		◆	↑↑	◆



# Test diagnostici (immunodepressi)

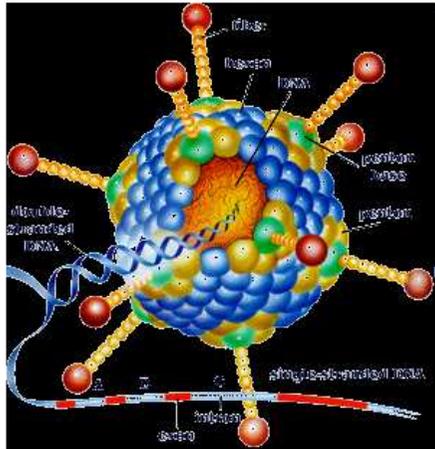


## ISOLAMENTO DEL VIRUS

- EBV infetta e immortalizzare linfociti umani in coltura
- Esame indaginoso non utilizzato in diagnostica

## IDENTIFICAZIONE DEL DNA VIRALE

- mediante PCR in campioni di saliva, sangue intero, tessuto linfoide



# ADENOVIRUS



- Devono il loro nome al fatto che sono stati isolati (nel 1953) da adenoidi rimosse chirurgicamente.
- Comprendono numerosissimi virus, >100 tipi diversi, 47 infettano l'uomo.
- Agenti eziologici delle comuni affezioni dell'apparato respiratorio e gastroenterico.

# ADENOVIRUS



Penetrano nell'organismo per via aerogena o congiuntivale e si diffondono subito all'apparato respiratorio e a quello gastrointestinale.

Vengono eliminati dall'organismo, a seconda della localizzazione, attraverso le secrezioni nasali e lacrimali, oppure con le feci.

Alcuni tipi possono dare infezioni persistenti ed altri provocano infezioni latenti con integrazione del DNA virale nel DNA cellulare.

# ADENOVIRUS



PATOLOGIA	PERSONE A RISCHIO
Insufficienza Respiratoria Acuta (B:7)	Reclute, studenti, ecc.
Faringiti (gruppo C: 1, 2, 5; B: 7)	Bambini
Gastroenteriti (gruppo F: 40, 41)	Bambini
Congiuntiviti (gruppo D: 28 sierotipi) Cheratocongiuntiviti (8)	Tutti
Polmoniti (7)	Bambini, reclute, ecc.
Cistiti emorragiche acute	Bambini
Polmoniti, meningoccefaliti, uretriti (7, 12, 32)	Immunocompromessi
Epatiti	Bambini, pazienti con trapianto di fegato

# Test diagnostici



Gold standard attuale:  
quantificazione di DNA  
in campioni di sangue  
intero mediante Real-  
Time PCR: rapidi  
riproducibile elavato  
significato clinico.

Quindi in un paziente trapiantato.....

CMV

EBV

ADENOVIRUS

HHV6-7-8

Mentre in un paziente **MENINGITE**  
a liquor limpido...

**CMV**

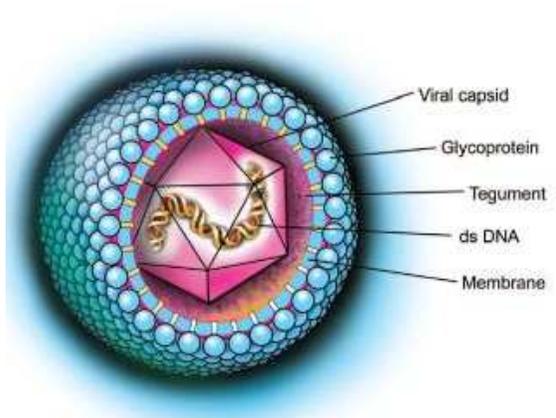
**EBV**

**ADENOVIRUS**

**HHV 6-7-8**

**HSV 1-2**

**ENTEROVIRUS**



HCMV Human Cytomegalovirus

# CMV



## Importanza del monitoraggio in:

- pazienti trapiantati
  - pazienti con immunodeficienza
- + rischio infezione congenita**

MICHAEL C. d.n. 1/11/04



Nel primo mese di vita broncopolmonite interstiziale bilaterale  
scarsa risoluzione

Esami ematici: GB 800/ $\mu$ L, L 9.7%  $\longrightarrow$  v.a. 79/ $\mu$ L

Eosinofilia

Aumento transaminasi

Bassi valori immunoglobuline sieriche

Sottopopolazioni linfocitarie: CD3 5%, CD19 1,7% NK 75%



**IMMUNODEFICIENZA GRAVE COMBINATA  
da deficit di ADA (Adenosina deaminasi)**

Infatti  $\downarrow$  valori di ADA

$\uparrow$  metaboliti tossici

MICHAEL C. d.n. 1/11/04



30/12/04 PCR CMV su sangue:

225 copie virali/ml



Inizia terapia anti-virale (Ganciclovir-Foscarnet)

Da allora PCR CMV su sangue sempre positiva a titolo non elevato in assenza di segni clinici di infezione o assente

Nel frattempo terapia sostitutiva con **ADAGEN** (enzima ricombinante) con aumento della conta linfocitaria

Oltre a - profilassi antibiotica e antifungina

- terapia sostitutiva con IVIG

MICHAEL C. d.n. 1/11/04



Nel 2009: trapianto midollo osseo

Monitoraggio settimanale tramite PCR di EBV, Adenovirus, CMV su sangue

PCR CMV negativa fino al 26/06/09:

9.000 → 100.000 copie virali/ml

Nel frattempo diarrea cronica intrattabile:

GVHD?

Infezione intestinale da CMV?



Istologia su mucosa intestinale: non suggestiva di infezione da CMV ma...

**PCR su biopsia di mucosa intestinale: POSITIVA**

MICHAEL C. d.n. 1/11/04



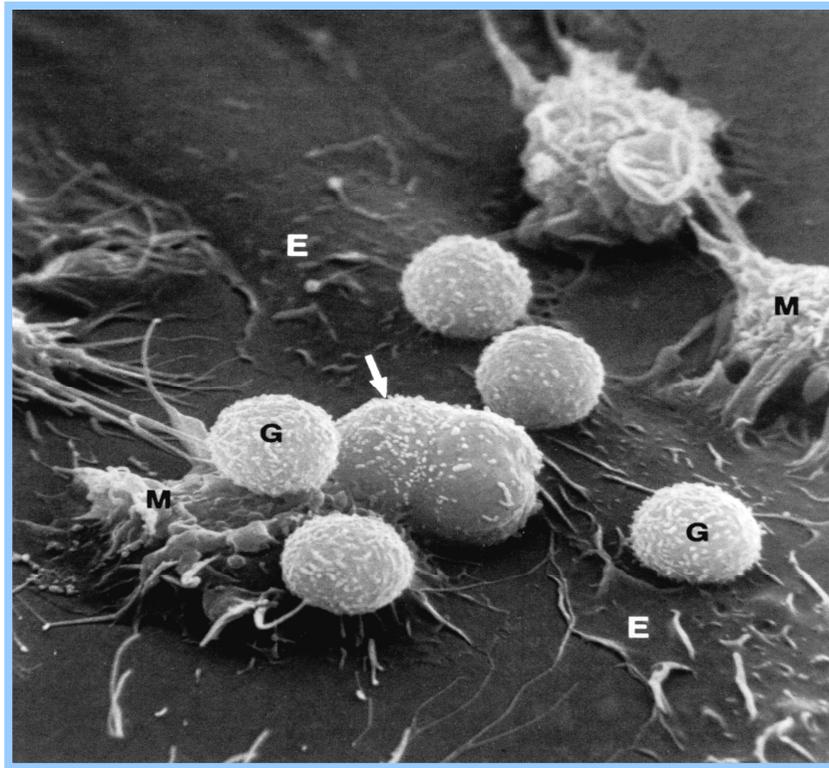
Progressivo miglioramento clinico

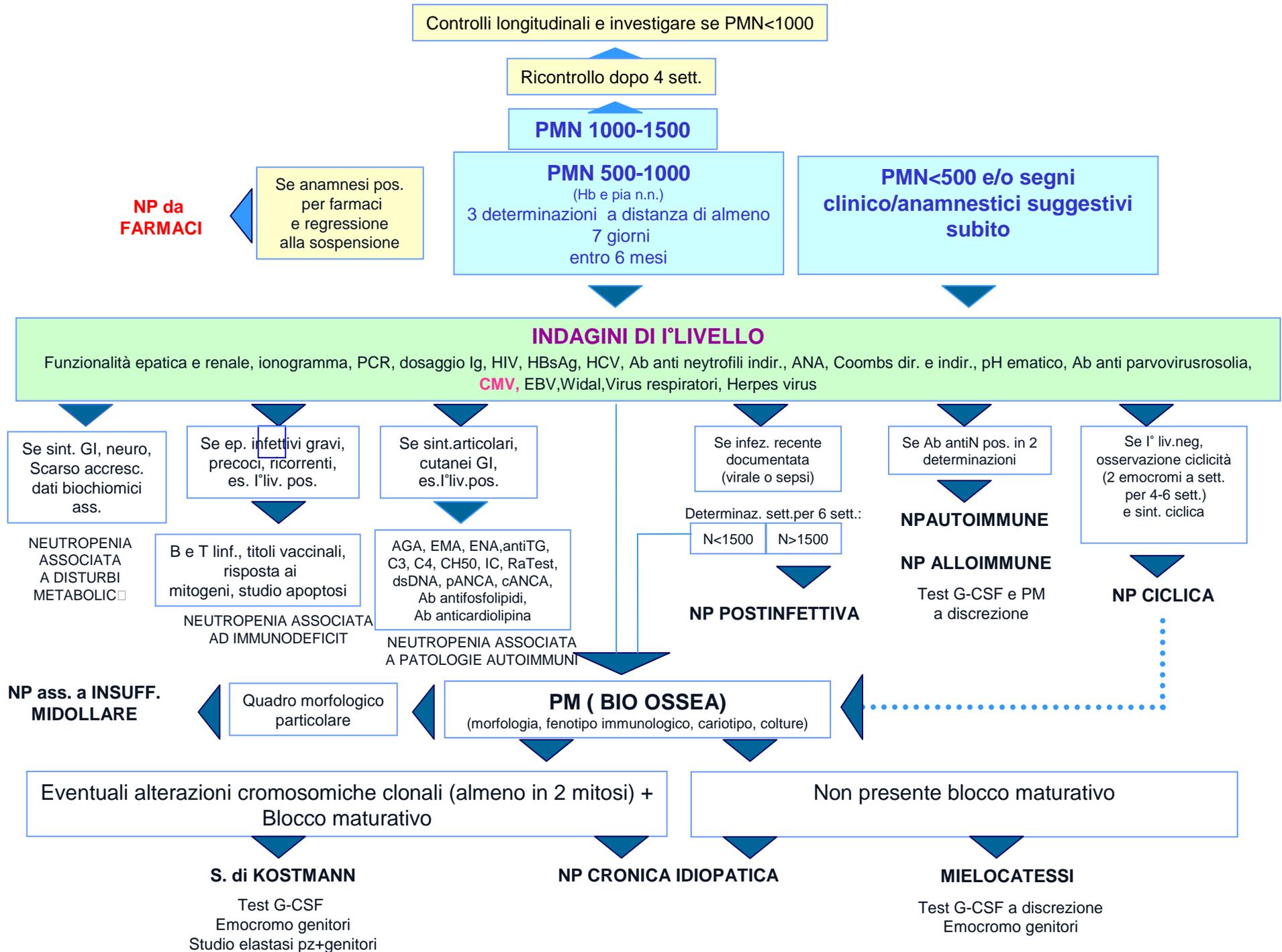
Nel corso del 2010:

Livelli oscillanti di copie virali su sangue  
fino ad aprile 2010 in assenza di  
manifestazioni cliniche

Da allora non più dosabile...

# NEUTROPENIA POST INFEZIONE DA CMV





# MATTIA n. 21/06/2008

Nato da I gravidanza normodecorsa, parto a termine vaginale eutocico.

IA 8-9. Peso 3.750 Kg.

Ittero fisiologico: fototerapia.

Vaccinazioni: tutti i vaccini da calendario

A.F.: ndn. Padre con recente infezione da CMV (dicembre 2008)

A.P.R.: niente di rilevante

*Giugno 2009* – bilancio di salute 12 mesi: **arresto accrescimento ponderale**

 **IVU?**

- Stick urine: PH 8, Proteine 50, nitriti +, alcuni cilindri  
(eseguita ABT con Cefixoral per 10 gg)
- Esami ematici: GB 7640 cell/ $\mu$ L, **N 7.9%(v.a. 603 cell/ $\mu$ L)** Hb 11g/dl, PLT 494000/ $\mu$ L

Il bambino viene quindi inviato al nostro DH per accertamenti

# INDAGINI DI I LIVELLO

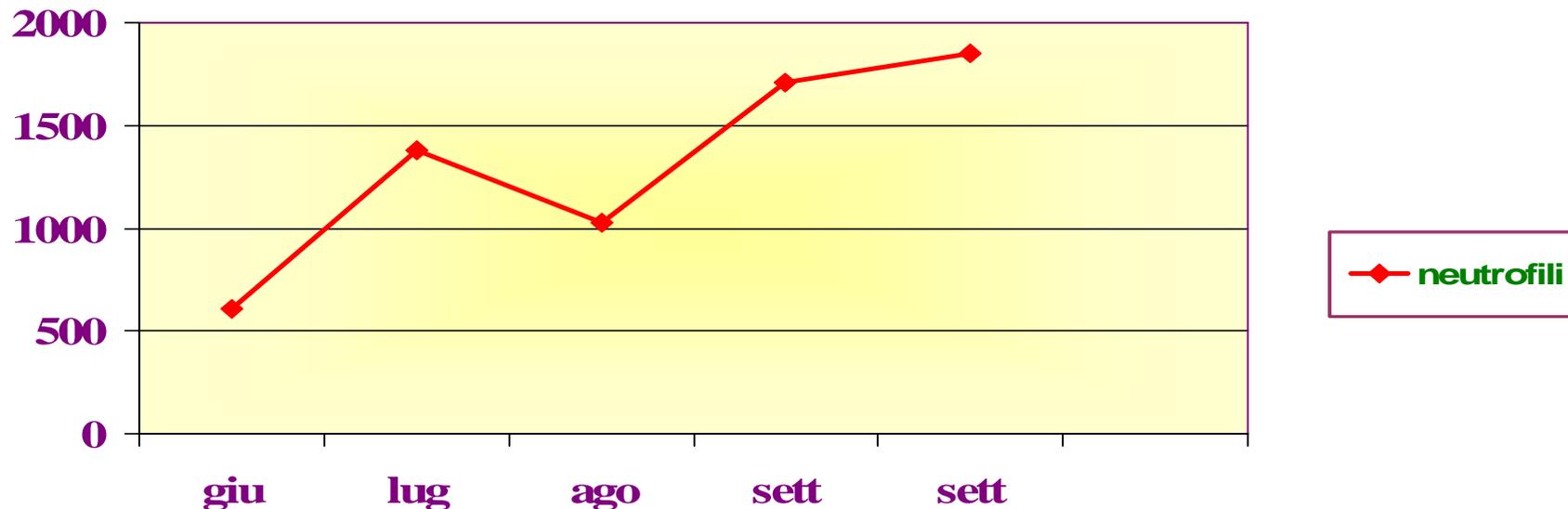
E.O.: nella norma

- Funzione epato-renale: nella norma
- Immunoglobuline sieriche: nella norma
- Ab anti-neutrofilo (IF indiretta): negativi
- Indagini infettivologiche: sierologia per EBV, PCR per Adenovirus, negative  
In 2 valutazioni a distanza di un mese **CMV IgM diminuite**, **CMV IgG aumentate**

3 controlli emocromo in 3 mesi: N 14.9% (v.a. 1379); N 18.7% (v.a. 1023); N 20.4% (v.a.1709)



## NEUTROPENIA POST-INFETTIVA



**MATTEO**

n. 05/07/2010

A.P.R.: ha effettuato accertamenti per prematurità (EG 35 sett per PROM); emocromo con formula leucocitaria nella norma

*Agosto 2010* -ricovero per episodi di vomito a getto:

•Esami ematici: GB 6190 cell/ $\mu$ L, N 10.5%(v.a. 650 cell/ $\mu$ L)

Hb 9.8 g/dl, PLT 481000/ $\mu$ L

*Settembre 2010*- GB 6060 cell/ $\mu$ L, N 7.1%(v.a.430 cell/ $\mu$ L)

*Ottobre 2010*- GB 8600 cell/ $\mu$ L, N 8.5% (v.a. 730 cell/ $\mu$ L)

IgG anti-CMV positive

IgM anti-CMV negative

Madre  sierologia per CMV pre-concepimento:  
infezione pregressa

**MATTEO**

n. 05/07/2010

Il bambino viene quindi inviato al nostro DH per accertamenti:

- GB 8230 cell/ $\mu$ L, N 10% (v.a. 823 cell/ $\mu$ L)
- Sierologia: IgG anti-CMV positive  
IgM anti-CMV negative
- PCR CMV qualitativa su sangue periferico:  
NEGATIVA
- PCR CMV su urine: POSITIVA  
analisi quantitativa:  
1.821.000 genomi virali/ml

**MATTEO** n. 05/07/2010

Non potendo escludere un'infezione congenita...

- visita oculistica
- visita audiologica
- ecografia transfontanellare

e.....

**PCR CMV su spot neonatale**

# PCR CMV su spot neonatale

Metodo molecolare applicabile su qualsiasi liquido biologico, anche su goccia di sangue su cartoncino prelevata anni prima!

+ spesso asint, ++ nei bambini

In adolesc e adulti immunocompetenti: sindrome simil-mononucleosi

In immunocompromessi: polmonite, colite, corioretinite

Infezione congenita (passaggio transplac): probab di trasmissione-+ alta se madre ha infez primaria- in gravidanza da madre con infez è 1%. Questi alla nascita eliminano CMV alla nascita (saliva, urine) Di questo, nel 10% dà manif cliniche: IUGR, ittero neonatale, porpora, epatosplenomegalia, microcefalia, danno cerebrale, calcificazioni cerebrali, retinite.

Infezione contratta durante il parto dalle secrezioni cervicali o da latte materno è asintomatica.

+ spesso infezione cong è asint, a vv deficit uditivi e cognitivi + tardi

Non noto periodo di incubaz se trasmis orizz (contaminaz salivare, contatto con urine infette)

Dg: isolamento CMV su liquido biologico entro 3 settimane dalla nascita. Pz del caso clinico poteva averlo avuto già positivo nelle prime sett di vita! Non lo sappiamo! Sierol non del tutto esauriente!

Al max aggiungere diapo con questi dati su infez cong