



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze del Farmaco

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE
INDIRIZZO: SCIENZE EPATOLOGICHE E GASTROENTEROLOGICHE
CICLO XXV

**STUDIO DEL RUOLO DELL'INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS UMANO
NELLE MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE INTESTINALI**

Direttore della Scuola: Ch.ma Prof.ssa Maria Teresa Conconi

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giacomo Carlo Sturniolo

Supervisore: Ch.mo Prof. Giacomo Carlo Sturniolo

Dottorando: Roberta Caccaro

INDICE

1	SOMMARIO	5
1.a	Sommario in lingua italiana	5
1.b	Abstract	9
2	INTRODUZIONE	11
2.a	Il Citomegalovirus umano (HCMV)	11
2.a.1	Genoma e struttura	11
2.a.2	Infezione dell'ospite e tropismo tissutale	12
2.a.3	Infezione latente e riattivazione virale	13
2.a.4	Ciclo di replicazione e assemblaggio del virus	14
2.a.5	Epidemiologia e trasmissione dell'infezione	14
2.a.6	Strategie di immuno-evasione di HCMV	15
2.a.7	Aspetti clinici dell'infezione	15
2.a.8	Diagnosi dell'infezione e monitoraggio	17
2.a.9	Principi di terapia dell'infezione	19
2.b	Le malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI)	20
2.b.1	Caratteristiche cliniche	20
2.b.2	Principi di patogenesi	21
2.b.3	Principi di terapia	23
2.c	HCMV e MICI	25
3	SCOPO	31
4	PAZIENTI, MATERIALI E METODI	33
4.a	Studio retrospettivo della frequenza di microinfezione da HCMV in biopsie intestinali	33
4.a.1	Pazienti	33
4.a.2	Immunohistochimica (IHC)	33
4.a.3	Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) per HCMV Immediate Early (IE) DNA	34
4.a.4	RT-PCR per HCMV miRNA UL112	35
4.b	Studio prospettico dell'immunità cellulare T HCMV-specifica	35
4.b.1	Pazienti	35
4.b.2	Sierologia per HCMV	37
4.b.3	Saggio EliSpot	37
4.c	Analisi statistica	39
5	RISULTATI	41
6	DISCUSSIONE	55
7	CONCLUSIONI	61
8	BIBLIOGRAFIA	63
9	RINGRAZIAMENTI	73

1. SOMMARIO

1.a. Sommario in lingua italiana

I pazienti affetti da malattia infiammatoria cronica intestinale (MICI) rappresentano una categoria emergente di soggetti a rischio di infezione/riattivazione di citomegalovirus (HCMV), data la natura infiammatoria della malattia e dato il sempre più frequente approccio terapeutico immunosoppressivo. Tuttavia il ruolo di HCMV in questa popolazione rimane ancora da chiarire. L'ipotesi attualmente più condivisa è che l'infezione, o più frequentemente la riattivazione virale, possa rappresentare un trigger di riaccensione della MICI e/o una causa di resistenza alla terapia medica. Tuttavia non è noto se tali evenienze siano da ricondurre ad una perdita di competenza del sistema immune nei confronti del virus secondaria alla terapia immunosoppressiva o alla esacerbazione della malattia infiammatoria cronica sottostante o al background immunologico proprio dei pazienti portatori di queste patologie. Particolare ruolo nella progressione di malattia potrebbe essere giocato dalla presenza di una microinfezione, ovvero di una infezione di basso grado, capace di mantenere uno stato di flogosi subclinica.

Gli scopi dello studio sono:

- 1) valutare la frequenza di microinfezione da HCMV nella mucosa intestinale di pazienti affetti MICI e la relazione con la presenza di infiammazione e con il tipo di trattamento medico in corso;
- 2) valutare l'immunità cellulare T HCMV specifica nei soggetti con MICI in relazione all'attività di malattia e al tipo di trattamento medico in corso.

Lo studio si è articolato in due parti:

- 1) la prima, retrospettiva, volta all'analisi di biopsie intestinali prelevate in corso di colonscopie eseguite per normale pratica clinica in pazienti consecutivi non selezionati. Sono state analizzate biopsie intestinali provenienti da pazienti con MICI e soggetti di controllo (che avevano eseguito colonscopia per screening o per sintomi gastrointestinali, senza riscontro tuttavia di alcuna lesione organica all'endoscopia e all'istologia). Le biopsie intestinali sono state analizzate mediante tecniche di immunoistochimica (IHC) ad alta sensibilità per la ricerca di microinfezione da HCMV (studio di antigeni "immediate early" (IE) e pp65). Da tali biopsie sono stati inoltre estratti DNA e RNA per l'analisi dell'espressione di IE-DNA e miRNA UL112 di

HCMV (quest'ultimo implicato nei meccanismi di immuno-evasione) mediante Real Time-PCR.

- 2) La seconda parte dello studio, volta all'analisi dell'immunità cellulare T HCMV-specifica, si è articolata in una parte trasversale ed in una prospettica. Sono stati prelevati 10 ml di sangue periferico da pazienti con MICI consecutivi, non selezionati, afferenti alla SOC gastroenterologia. La stratificazione dei pazienti è stata eseguita sulla base degli indici di attività clinica di malattia validati per la malattia di Crohn (MC) e la colite ulcerosa (CU). Dai campioni di sangue periferico sono state estratte le cellule mononucleate (PBMCs), successivamente utilizzate nel saggio immunoenzimatico EliSpot dopo opportuna stimolazione con miscela di peptidi immunogenici di HCMV. Si sono considerati come normali livelli di immunità i casi che esprimessero almeno 20 spot forming colonies (SFCs)/200000 PBMCs.

Nello studio retrospettivo sono stati inclusi 32 pazienti (11 con MC e 21 con CU) e 8 soggetti di controllo; sono state studiate mediante IHC complessivamente 116 biopsie intestinali raccolte nel corso di 55 esami endoscopici diversi. 84 su 116 biopsie (72%) provenivano da mucosa infiammata di soggetti con MICI; nei rimanenti casi da mucosa sana di soggetti con MICI o dai soggetti di controllo. Nel complesso, l'IHC per l'antigene IE di HCMV ha dato esito positivo nel 43% delle biopsie studiate; la totalità delle biopsie positive all'antigene IE proveniva da aree infiammate. L'IHC per l'antigene pp65 è risultata positiva nel 45% delle biopsie. In nessuna delle biopsie raccolte dai controlli è stata riscontrata positività per l'antigene IE, e solo in una biopsia è emersa una debole positività per pp65 in poche cellule epiteliali e della lamina propria. La positività ad entrambi gli antigeni è stata riscontrata più frequentemente nelle biopsie provenienti da mucosa infiammata rispetto a quelle provenienti da mucosa sana di soggetti con MICI. Questa maggior frequenza è stata riscontrata anche rispetto alle biopsie intestinali provenienti dai soggetti di controllo. Al contrario, non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa nella frequenza della positività agli antigeni di HCMV nelle biopsie provenienti dai controlli rispetto a quelle provenienti da aree di mucosa esente da infiammazione di soggetti con MICI. La presenza di terapia immunosoppressiva al momento della colonscopia non è risultata associata ad un maggior rischio di avere l'IHC positiva per l'antigene IE o pp65, sia che fosse utilizzata in monoterapia che in associazione. Nel complesso, i soggetti affetti da MICI non immunosoppressi avevano tuttavia più frequentemente una positività antigenica rispetto ai soggetti di controllo, anch'essi non immunosoppressi ($p = 0.001$ per IE; $p = 0.007$ per pp65). Su 40 biopsie intestinali, provenienti da 30 differenti pazienti, è stato

estratto il DNA ed eseguita la ricerca del genoma di HCMV mediante RT-PCR diretta contro il gene Major IE. Tale ricerca ha dato esito negativo in 26 casi (65%). I livelli di espressione del gene IE di HCMV sono risultati essere molto inferiori rispetto allo standard di riferimento (DNA proveniente da fibroblasti infettati in coltura), senza differenza significativa tra campioni provenienti da mucosa infiammata e non infiammata dei soggetti con MICI. Su 24 biopsie è stata eseguito uno studio di carattere esplorativo dell'espressione del miRNA specifico per HCMV UL112, riscontrandone la positività nel 100% dei campioni analizzati. Anche in questo caso i valori di espressione erano inferiori allo standard di riferimento.

Nello studio prospettico volto a studiare l'immunità cellulare T HCMV-specifica nei pazienti affetti da MICI sono stati arruolati complessivamente 167 pazienti; di questi 125 (75%) erano già stati esposti all'infezione da HCMV, manifestando una sierologia IgG positiva. Il 13% dei pazienti ha dimostrato una bassa risposta immunitaria T-mediata nei confronti di HCMV, con una mediana di 6 SFCs/200000 PBMCs (range 0-19). Dodici di questi 17 pazienti stavano assumendo terapia immunosoppressiva. In 10 pazienti la malattia infiammatoria intestinale era almeno lievemente attiva secondo il corrispondente score clinico. Il 29% dei pazienti aveva una risposta HCMV-specifica intermedia, con una mediana di 60.5 SFCs/200000 PBMCs (range 24-99), mentre la maggioranza aveva una risposta elevata, con una mediana di 199.5 SFCs/200000 PBMCs (range 100-1000). Non sono stati osservati differenti livelli di immunità HCMV-specifica nella MC e nella CU, indipendentemente dallo stato di attività di malattia. La terapia medica in corso non è risultata influente sui livelli di immunità HCMV-specifica, sia nella MC che nella CU; il tipo di immunosoppressore (steroidi sistemici, tiopurine, biologici) o il numero di immunosoppressori in combinazione non si è associato a differenze significative nel numero di SFCs al test EliSpot. In particolare, 19 pazienti indirizzati alla terapia biologica anti-TNF α che sono stati valutati con IFN- γ EliSpot immediatamente prima di iniziare il trattamento e con un prelievo nel corso del mantenimento, non hanno subito una significativa modificazione dei valori di immunità.

In conclusione, sembra plausibile che il virus che alberga in forma latente nell'organismo ospite risenta favorevolmente dell'ambiente infiammatorio tipico delle MICI in fase attiva e che sia questo a determinarne la riattivazione virale, indipendentemente dal trattamento medico in corso. Tuttavia, il virus metterebbe subito in atto meccanismi volti a ripristinare la fase di latenza per evitare che il sistema immune dell'ospite, riattivando ed espandendo il compartimento cellulare T HCMV-specifico, riesca a eliminare, almeno in parte, l'infezione.

1.b. Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) patients are an emerging category of patients at risk of HCMV infection, because they are often immunosuppressed and because HCMV has preferential tropism for sites of inflammation. However, the role of the virus in this population of patients is still unclear. Current and most widely theories suggest that HCMV could be responsible for flares and/or make the patient develop resistance to medical treatment; besides, some data suggest that HCMV infection could be responsible for a more aggressive course of the disease. We still do not know if the flare of HCMV is related to a loss of competence of the immune system in IBD patients due to immunosuppressive medications or to the reactivation of the disease itself.

Aims of the study were:

- 1) assessment of low-grade HCMV infection (microinfection) on colonic biopsies from a cohort of IBD patients and evaluation of the correlation with inflammation and the therapeutical regimen.
- 2) assessment of HCMV specific T-cell response in IBD patients in peripheral blood and evaluation of its possible correlation with disease activity and type of treatment.

The first part of the study has been conducted on a retrospective cohort of consecutive non-selected IBD patients and controls (patients who performed colonoscopy for colorectal cancer screening or because of gastrointestinal symptoms, without any pathological finding at endoscopy and at histological examination). Intestinal biopsies were evaluated through a highly sensitive immunohistochemistry (IHC) protocol for HCMV immediate early (IE) and pp65 antigens. In addition real time PCR for HCMV IE-DNA and micro-RNA UL112 (the latest being involved in immune-evasion strategies) was performed.

The HCMV-specific T cell response was evaluated in a prospective cohort of consecutive, non-selected IBD patients (in a cross-sectional and longitudinal study). For each patient the HCMV serology status was evaluated and in IgG-positive patients the HCMV-specific T-cell response was assessed in monocytes from peripheral blood (PBMCs), using an IFN- γ EliSpot assay. Patients were stratified according to the disease clinical activity indexes validated for Crohn's disease (CD) and for ulcerative colitis (UC) and according to the therapeutic regimen. Levels of HCMV-specific immune response were considered normal if the EliSpot assay displayed at least 20 spot forming colonies (SFCs)/200000 PBMCs.

The retrospective part of the study was conducted on 32 IBD patients (11 CD and 21 UC) and 8 controls; a total of 116 biopsies (collected during 55 different colonoscopies) were analyzed using IHC for HCMV antigens. 84 biopsies (72%) were collected on inflamed mucosa, while the remaining from uninflamed mucosa of IBD patients or from healthy mucosa from controls. IE-IHC was positive in 43% of the biopsies; none of them were from uninflamed mucosa; pp65-IHC was positive in 45% of biopsies, only one coming from a control patient. Intestinal inflammation was associated to an increased percentage of HCMV-IHC positivity; no difference was observed between biopsies collected from uninflamed mucosa of IBD patients and from control subjects. Immunosuppressive therapy (both monotherapy and combination therapy) was not associated with an increased risk of HCMV antigens positivity at IHC. However, non-immunosuppressed IBD patients were more frequently HCMV positive than controls. The study of HCMV IE-DNA expression was performed on 40 intestinal biopsies, with no evidence of HCMV in 65% of cases. In the positive cases the levels of expression were significantly inferior to the reference standard, with no difference between biopsies collected from inflamed and non-inflamed areas. A pilot study of the expression of HCMV UL112 microRNA has been performed on 24 biopsies; this microRNA was expressed in all the biopsies studied, however levels of expression were significantly inferior to the reference standard.

In the prospective study 167 patients were enrolled and 125 (75%) were HCMV IgG-positive. 13% patients had low levels of HCMV-T cell specific response with a median value of 6 SFCs/200000 PBMCs (range 0-19). Twelve out of these 17 patients were on immunosuppressive therapy at the time of inclusion in the study. In 10 patients the disease was at least mildly active. The 29% of patients had moderate response (median 60.5 SFCs/200000 PBMCs (range 24-99); the majority of patients displayed a high HCMV specific immune response (median 199.5 SFC/200000 PBMCs (range 100-1000)). CD and UC patients displayed similar levels of specific response. Medical therapy did not influence the levels of immunity (in terms of number and types of immunosuppressors used). In particular, 19 patients tested before and after the beginning of anti-TNF therapy did not display a significant change in the specific levels of immunity.

In conclusion, it seems plausible that latent virus could reactivate in inflammatory conditions, regardless the therapeutic regimen of the patient. On the other hand, the virus activates immune-evasion strategies in order to restore the latency status and ensure its own persistence in the host.

2. INTRODUZIONE

2.a. Il Citomegalovirus umano (HCMV)

Il citomegalovirus umano (HCMV), altrimenti detto herpes virus 5 (HHV-5), appartiene alla famiglia *Herpesviridae*, membro della sottofamiglia *Betaherpesvirinae*, largamente diffuso nella popolazione generale (60-90%). L'infezione di norma viene acquisita in età precoce e si trasmette attraverso il contatto interpersonale per scambio di fluidi biologici; dopo l'infezione primaria, che decorre perlopiù in maniera asintomatica negli individui immunocompetenti, il virus persiste in uno stato di latenza all'interno dell'organismo ospite.¹

La natura patogena di HCMV è emersa nel corso degli ultimi decenni osservando che l'infezione primaria o la riattivazione virale in soggetti portatori di AIDS o immunosoppressi perché sottoposti a trapianto è causa di un significativo incremento in morbilità e mortalità.^{1,2} Più recentemente è stato inoltre ipotizzato che HCMV possa intervenire nei processi cronici di infiammazione e di autoimmunità, in termini di fattore trigger e/o promuovente la progressione della patologia già in atto.³

2.a.1. Genoma e struttura

Il genoma di HCMV consiste in una molecola di DNA lineare a doppio filamento ed è il più grande e complesso tra i genomi nella famiglia Herpes (230-240 kbp).^{2,4,5} Il genoma è composto da due domini: unique long (UL) e unique short (US). Ai lati di ciascuno dei due domini si trovano le sequenze ripetitive interne e terminali (IR_S, IR_L e TR_S e TR_L, rispettivamente). La struttura genomica di HCMV è rappresentata schematicamente in Figura 1. Sono presenti inoltre tra 200-250 sequenze "open reading frames" (ORFs) dislocate nei vari segmenti del genoma e suddivise in "immediate early" (IE), "early" (E) e "late" (L) a seconda della fase dell'infezione durante la quale il loro mRNA è rintracciabile nel citoplasma della cellula infettata. Si ritiene che solo circa 50 di queste ORFs codifichino proteine essenziali alla replicazione virale e alla produzione di nuovi virioni; ciò significa che la maggior parte delle proteine di HCMV potrebbe interferire con i processi cellulari dell'ospite, allo scopo di manipolare e modularne la risposta immunitaria.

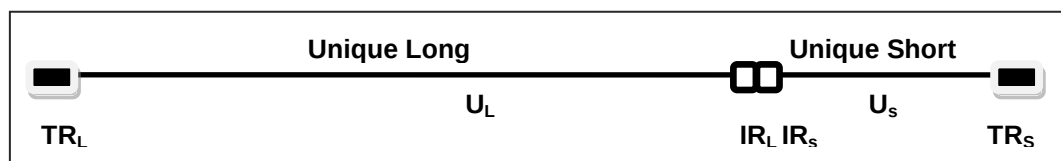


Figura 1: Rappresentazione schematica della struttura genomica di HCMV.

Il genoma di HCMV è racchiuso da un capsidico icosaedrico, composto per circa il 90% dalla proteina capsidica maggiore (MCP) codificata da UL86. Almeno 25 differenti proteine (perlopiù fosforilate) caratterizzano il tegumento, che separa il capsidico dall'envelope. La funzione della maggior parte di queste proteine non è ancora ben codificata, ma alcune sembrano intervenire nei processi di assemblaggio e liberazione dei virioni. Le più importanti proteine tegumentarie sono pp150 e pp65, entrambe altamente immunogeniche. La superficie esterna di HCMV è costituita dall'envelope, composto da glicoproteine virali e componenti cellulari (lipidi e proteine) derivanti dalle membrane intracellulari della cellula ospite (Figura 2). Le glicoproteine virali esposte sull'envelope rappresentano un target importante della risposta anticorpale e partecipano nei processi di produzione di virioni infettanti, di legame virus-cellula e di diffusione del virus tra le cellule dell'ospite.

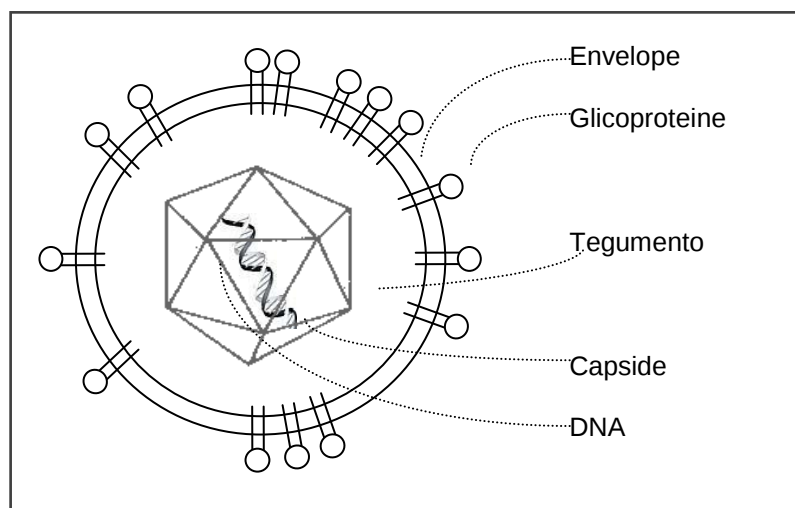


Figura 2: Rappresentazione schematica della struttura di HCMV.

2.a.2. Infezione dell'ospite e tropismo tissutale

L'ingresso di HCMV nella cellula ospite è mediato dal legame tra le glicoproteine virali dell'envelope e i recettori sulla superficie della cellula ospite (in particolare proteoglicani eparan-solfati, $\beta 2$ microglobulina, CD13, recettore del fattore di crescita epiteliale e epidermico, recettore del fattore di crescita derivante dalle piastrine, annessina II).⁶ Dopo il legame, l'envelope si fonde con la membrana plasmatica con meccanismi pH-dipendenti e indipendenti.⁷ Il sito di ingresso è più frequentemente l'epitelio delle mucose del tratto digestivo superiore, del tratto genito-urinario e del

tratto respiratorio, anche se le cellule di pressoché tutti gli organi sono suscettibili all'infezione da parte di HCMV.⁸ In aggiunta alle cellule epiteliali, l'infezione può avvenire nei monociti, macrofagi, cellule dendritiche, cellule endoteliali, cellule muscolari lisce, cellule stromali, fibroblasti, neuroni ed epatociti. Tuttavia, se l'infezione è potenzialmente possibile in tutte le cellule, la capacità di replicazione e di stabilire la latenza non è equivalente nei vari tipi cellulari, essendo meno efficace nelle cellule endoteliali, monociti e macrofagi rispetto ai fibroblasti (prototipo cellulare utilizzato per la crescita del virus *in vitro*). L'espressione di HCMV può essere ristretta a geni di fase IE e E, in tal caso si parla di infezione non-produttiva o non-permissiva.⁹ Oltre che dal tipo cellulare, la replicazione virale può inoltre essere influenzata dalla fase di differenziazione cellulare. Se infatti nei monociti l'espressione virale è ristretta a geni IE e E, nei macrofagi completamente differenziati il virus è in grado di esprimere completamente il proprio genoma e dare luogo ad una infezione produttiva.

2.a.3. Infezione latente e riattivazione virale

Dopo l'infezione primaria HCMV persiste in forma latente nell'organismo ospite. Nonostante la capacità di infettare pressoché tutti gli organi umani, il sito preferenziale di latenza è rappresentato dai monociti/macrofagi e dalle cellule endoteliali e sembra che il virus stimoli l'interazione tra questi due tipi cellulari allo scopo di favorire la diffusione virale nell'organismo ospite.¹⁰ Durante la fase di latenza il genoma virale è mantenuto a bassi livelli (approssimativamente 10 copie/cellula) e l'infezione non è permissiva.¹¹ Tuttavia, la riattivazione virale e il completo ciclo di replicazione virale sono stati descritti nei macrofagi differenziati e proprio il processo di differenziazione cellulare sembra essere responsabile della riattivazione virale, attraverso la creazione di un ambiente favorevole.^{12,13} La transizione monocita-macrofago avviene sotto lo stimolo di citochine, in particolare interferone-gamma (IFN- γ) e tumor necrosis factor-alfa (TNF- α), prodotte dai linfociti T attivati. Queste citochine attivano il promotore dei geni IE di HCMV nelle cellule mieloidi, favorendo pertanto la riattivazione virale. I meccanismi molecolari con cui HCMV è in grado di riattivarsi dalla fase di latenza non sono noti nel dettaglio. Il ruolo di IFN- γ e TNF- α in questo processo ha importanti risvolti clinici, dato che i processi immunitari mediati dall'attivazione delle cellule T e dalla produzione di queste citochine potrebbero favorire la riattivazione virale nei macrofagi nel corso di molteplici patologie infiammatorie e autoimmunitarie.¹⁴⁻¹⁶

2.a.4. Ciclo di replicazione e assemblaggio del virus

Il ciclo di replicazione di HCMV richiede circa 48-72 ore per completarsi e il rilascio di virioni raggiunge il picco dopo circa 5-7 giorni di accumulo di particelle virali. Dopo la fusione dell'envelope con la membrana plasmatica della cellula ospite il capside e il tegumento vengono trasportati nel nucleo cellulare dove il DNA virale viene quindi liberato.

L'espressione dei geni virali segue 3 fasi: IE, E e L e l'inizio dell'espressione dei geni IE avviene immediatamente dopo l'ingresso nel nucleo. I geni IE codificano proteine non strutturali ma necessarie a regolare la successiva espressione di geni E e L e forse anche l'espressione di geni cellulari. Anche i geni E codificano proteine non strutturali, questa volta necessarie però alla replicazione del DNA virale (come la HCMV-DNA polimerasi). Infine i geni L codificano proteine strutturali del capside e dell'envelope, necessarie per l'assemblaggio dei virioni.

I nuovi capsidi contenenti genoma virale vengono prodotti nel nucleo, mentre l'acquisizione dell'envelope avviene per passaggi successivi dal nucleo all'apparato del Golgi e infine alla membrana citoplasmatica, attraverso la quale il virione viene rilasciato all'esterno.^{4,5}

2.a.5. Epidemiologia e trasmissione dell'infezione da HCMV

Si ritiene che dal 60% al 90% della popolazione mondiale sia stata esposta a HCMV. Il tasso di infezione varia a seconda della localizzazione geografica e delle condizioni socioeconomiche, raggiungendo il 100% nelle popolazioni in via di sviluppo. L'infezione è generalmente acquisita in età tanto più precoce quanto più scadenti sono le condizioni socioeconomiche della popolazione in esame.^{17,18} La trasmissione dell'infezione avviene attraverso il contatto con fluidi biologici infetti.¹⁸ Dopo l'infezione primaria le particelle infettanti di HCMV rimangono presenti per anni in sangue, urina, saliva, lacrime, sperma e secrezioni vaginali. Esiste la possibilità di una trasmissione verticale, che causa un'infezione congenita dovuta alla viremia materna in corso di gravidanza. L'infezione può inoltre essere acquisita nel periodo perinatale, per contatto del neonato con le secrezioni genitali infette della madre al momento del parto e/o attraverso l'allattamento. Infine le trasfusioni di emoderivati, i trapianti d'organo e di midollo osseo possono veicolare il virus sia in forma attiva che latente.

2.a.6. Strategie di immuno-evasione di HCMV

La capacità di HCMV di persistere nell'organismo ospite in tempo indefinito deriva dalla sua abilità di evadere il sistema immunitario dell'ospite. In aggiunta, il virus è capace di manipolare la risposta immunitaria dell'ospite a proprio vantaggio, in modo da garantire la possibilità di riattivarsi e di diffondersi.³ Per fare questo nel corso dell'evoluzione il genoma di HCMV si è modificato in modo da produrre proteine capaci di interferire con i meccanismi di immunosorveglianza dell'ospite, appartenenti sia al braccio dell'immunità innata che di quella adattativa. Il virus è infatti in grado di inibire l'espressione delle molecole MHC di classe I e II sulla superficie delle cellule dendritiche interferendo quindi con i meccanismi di presentazione dell'antigene, evento cruciale della risposta immunitaria agli organismi patogeni.¹⁹ Altera inoltre il pattern di secrezione citochinica delle cellule dendritiche, ne sopprime la capacità di migrare e di stimolare i linfociti T citotossici.^{20,21} Questi molteplici effetti sulle cellule dendritiche inducono il ritardo o la prevenzione nella produzione di cloni di cellule T HCMV-specifiche. Il virus è capace in oltre di eludere il riconoscimento delle cellule infette da parte delle cellule natural killer e dei linfociti T citotossici, garantendo quindi la sopravvivenza della cellula infetta. HCMV mette in atto strategie di evasione anche del braccio umorale della risposta immunitaria. Il virus produce infatti degli omologhi del recettore di Fc^{22,23} e stimola la produzione di recettori di Fc sulla superficie cellulare²⁴ attirando le IgG e creando un rivestimento di IgG sulla superficie della cellula infetta, che non è quindi esposta alla diretta azione del complemento e delle IgG HCMV specifiche. Infine produce dei regolatori dell'attivazione del complemento (CD35, CD 46 e CD55) volti a proteggere la cellula infettata dalla lisi mediata dal complemento.^{25,26}

2.a.7. Aspetti clinici dell'infezione da HCMV

Prima di considerare le manifestazioni cliniche dell'infezione da HCMV è opportuno dare alcune definizioni preliminari, in quanto all'infezione non necessariamente consegue una malattia.^{27,28}

Infezione: è possibile isolare il virus (genoma o proteine) in un qualsiasi fluido biologico o tessuto.

Infezione attiva: replicazione virale attiva nel sangue periferico o in uno specifico organo in esame o significativo incremento del titolo anticorpale.

Infezione latente: presenza di genoma senza replicazione attiva.

Infezione primaria: infezione attiva in un soggetto precedentemente sieronegativo.

Riattivazione: infezione attiva in un soggetto precedentemente sieropositivo.

Malattia da HCMV: sono presenti le manifestazioni cliniche dell'infezione.

La presentazione clinica dell'infezione da HCMV è condizionata dallo stato immunitario dell'ospite.²

L'organismo umano, seppur immunocompetente, non è in grado di eliminare HCMV, che rimane quindi in forma latente preferenzialmente nei monociti. Se l'equilibrio tra virus e ospite viene mantenuto, difficilmente il virus è capace di causare una sintomatologia di rilievo. L'assenza di una efficace risposta immunitaria, mediata in particolar modo dalle cellule T, è essenziale per la patogenesi della malattia da HCMV.¹ Per questa ragione l'importanza di HCMV come patogeno umano si è manifestata solo con l'emergere di categorie di pazienti particolarmente a rischio: gli immunosoppressi.

Nei soggetti immunocompetenti l'infezione decorre di norma in forma asintomatica; in una minoranza dei casi può dare luogo a una sindrome simil-mononucleosica con astenia, rash, febbre, mialgie, cefalea, linfadenopatia laterocervicale e splenomegalia. Raramente può manifestarsi in forme più severe, come polmonite, miocardite, anemia, retinite, gastroenterite, epatite, neuropatia periferica e sindrome di Guillain-Barré. Dopo l'infezione il virus può persistere fino ad un anno nei fluidi biologici ed il rischio di trasmettere l'infezione è maggiore in presenza di sintomi piuttosto che nelle forme asintomatiche.²⁹

Nei pazienti immunosoppressi per AIDS, nei soggetti trapiantati d'organo o di midollo osseo e nei pazienti oncologici sottoposti a chemioterapia, l'infezione primaria da HCMV, la riattivazione o la reinfezione rappresentano un importante fattore di morbilità e mortalità, dando luogo a forme cliniche molto severe.³⁰ La disponibilità di protocolli terapeutici anti-retrovirali per il trattamento dell'infezione da HIV (HAART) ha diminuito sensibilmente l'incidenza di infezioni opportunistiche nei malati di AIDS, comprese le manifestazioni da HCMV.³¹ Anche nella trapiantologia l'utilizzo di trattamenti antivirali in profilassi o terapie *pre-emptive* hanno significativamente ridotto le manifestazioni cliniche da HCMV secondarie agli intensi regimi immunosoppressivi del post-trapianto, con una riduzione nei tassi di morbilità e mortalità.³²

Anche l'infezione congenita, che avviene in circa l'1% delle nascite, può dar luogo ad esiti infausti, specie se acquisita durante la prima metà della gravidanza.³⁰

2.a.8. Diagnosi dell'infezione da HCMV e monitoraggio

La maggior parte delle infezioni primarie non viene diagnosticata dato il decorso frequentemente sub-clinico. La diagnosi precoce e accurata di infezione da HCMV è fondamentale in quei soggetti per i quali la malattia ha un impatto sostanziale in termini di mortalità e morbidità, come nei neonati e negli immunosoppressi.

La sierologia permette di individuare la pregressa esposizione al virus mediante il dosaggio degli anticorpi IgG specifici per HCMV che persistono per tutta la vita nel sangue dei soggetti infettati. Questo tipo di indagine è particolarmente rilevante nei donatori di sangue e organi. Per identificare una diagnosi recente è sufficiente il riscontro di siero-conversione in un soggetto precedentemente IgG negativo. Per stabilire se si tratti di un'infezione recente può anche essere eseguito il dosaggio delle IgM.³³ Il riscontro di IgM aumentate non è tuttavia specifico di infezione primaria, dato che possono aumentare anche in corso di riattivazione di infezione.^{34,35} Ci si può avvalere anche dell'indice di avidità delle IgG: durante le fasi precoci dell'infezione infatti le IgG hanno bassa avidità e maturano successivamente una maggiore avidità con il progredire dell'infezione primaria. La diagnosi di infezione primaria è cruciale nelle donne in gravidanza: in questi casi infatti il decorso ha una prognosi peggiore rispetto alle riattivazioni.^{36,37} La sierologia è una metodica valida nei soggetti immunocompetenti, ma perde di utilità nei soggetti immunocompromessi, nei quali è necessario applicare differenti metodiche per stabilire la diagnosi di infezione da HCMV. In questi casi ci si deve avvalere di metodiche che permettano una diagnosi diretta di infezione, identificando il patogeno direttamente nel sangue o nel tessuto specifico. Il riconoscimento della presenza del virus in un tessuto malato non è indice di una diretta causalità tra infezione e danno d'organo, pertanto la valutazione clinica complessiva è fondamentale per la corretta interpretazione dei risultati di tali metodiche di diagnosi diretta.¹ Tali metodiche consistono in:^{1,2}

- coltura: tecnica riservata a laboratori altamente specializzati; di difficile applicazione nella pratica clinica perché richiede fino a 21 giorni per indurre il caratteristico effetto citopatico nei fibroblasti in coltura (coltura convenzionale). Può essere utile nella valutazione della resistenza alla terapia antivirale. La coltura in fibroblasti può essere resa di più rapido impiego utilizzando una tecnica di staining a immunofluorescenza, utilizzando anticorpi diretti contro l'antigene IE di HCMV (coltura rapida).
- antigenemia: quantifica i leucociti positivi per l'antigene pp65 mediante un saggio ad immunofluorescenza. È un test rapido, che fornisce una risposta in poche ore, ma

fornisce una diagnosi indiretta di disseminazione dell'infezione, perché pp65 può essere trasferito ai leucociti non infettati da parte di cellule infettate mediante una transitoria fusione delle membrane plasmatiche e lo scambio di materiale citoplasmatico. È un test sensibile e specifico anche nei soggetti immunodepressi.

- DNAemia: consiste nella determinazione del genoma virale nel circolo sanguigno mediante tecniche di biologia molecolare, ovvero PCR qualitativa o quantitativa. Le medesime tecniche possono essere applicate anche ad altri tessuti o fluidi biologici (urina, saliva, tessuto biotico). La determinazione della carica virale mediante analisi quantitativa è di maggiore utilità clinica per stabilire la prognosi e la risposta alla terapia nei soggetti immunodepressi. Queste metodiche sono limitate dal fatto che sono costruite in maniera diversa nei vari laboratori, senza una standardizzazione condivisa; pertanto risultati provenienti da diversi laboratori non sono al momento comparabili.

- RNAemia: buon marcatore di infezione attiva e di malattia da HCMV. Nuove tecniche di amplificazione di unspliced mRNA sono in fase di sviluppo per garantire una maggiore affidabilità del test anche in presenza di un background di DNA; risultati promettenti in soggetti affetti da AIDS o post-trapianto.

- esame istopatologico: prevede l'analisi convenzionale del preparato istologico in ematossilina ed eosina (H&E) per l'identificazione del tipico effetto citopatico indotto da HCMV, che conferisce al nucleo della cellula infetta un aspetto ad "occhio di civetta" (inclusione nucleare basofila circondata da un alone più chiaro). È necessario che l'osservazione sia condotta da un patologo esperto.

- immunoistochimica (IHC): prevede l'utilizzo di anticorpi monoclonali diretti contro specifici antigeni virali; permette di aumentare la sensibilità diagnostica della semplice analisi in H&E.^{38,39}

- ibridazione in situ (ISH): permette di identificare il genoma di HCMV nel contesto del tessuto.

- ricerca del DNA virale nelle feci: è stata proposta la ricerca del genoma virale nelle feci nei soggetti con sospetta colite da HCMV, come metodica non invasiva in sostituzione alla ricerca del DNA virale nelle biopsie coliche. Risultati promettenti.⁴⁰

È stato proposto, nei soggetti sottoposti a trapianto, di adottare delle tecniche di monitoraggio dell'infezione da HCMV, allo scopo di selezionare i pazienti che potrebbero beneficiare di una terapia nella fase asintomatica dell'infezione (*pre-emptive*) piuttosto che adottare un approccio di profilassi universale.⁴¹ Questo

permetterebbe di trattare un numero minore di pazienti e di evitare l'emergenza di malattia da HCMV al termine della profilassi stessa. Per fare questo è stato proposto il monitoraggio della risposta immunitaria T-mediata specifica nei confronti di HCMV. Esistono differenti metodiche di laboratorio per lo studio dell'immunità cellulare: l'intracellular cytokine staining (ICS) e il saggio EliSpot prevedono la misurazione della produzione di IFN- γ da parte di cellule mononucleate estratte da sangue periferico e stimulate con una miscela di antigeni pp65.⁴² Entrambi permettono la quantificazione dei linfociti T specifici per gli antigeni di HCMV, ma la tecnica ICS permette anche di discriminare tra cellule T CD4+ e CD8+. Questo vantaggio è però gravato da un significativo incremento dei costi e dei tempi di esecuzione. Stanno emergendo in letteratura dati promettenti sull'utilizzo del test EliSpot in vari settori della trapiantologia (trapianto di polmone, cuore e cellule staminali) come metodica per il monitoraggio dei soggetti a maggior rischio di infezione.⁴³⁻⁴⁵

2.a.9. Principi di terapia dell'infezione da HCMV

L'indicazione al trattamento dell'infezione da HCMV è generalmente riservato ai pazienti immunocompromessi, essendo l'infezione autolimitantesi nel soggetto immunocompetente. Gli approcci terapeutici si possono classificare come segue:^{1,2,46}

- a) terapia profilattica (in assenza di replicazione virale): ha lo scopo di prevenire la riattivazione virale o l'infezione primaria e le sue conseguenze cliniche. La sua utilità clinica è ancora controversa a causa dei dati contrastanti sia nella popolazione di soggetti affetti da AIDS che nei soggetti trapiantati; in aggiunta va tenuto conto del rapporto costo-efficacia, anche in considerazione degli effetti collaterali cui verrebbero esposti tutti i pazienti.
- b) terapia *pre-emptive* (per la soppressione della replicazione virale in assenza di sintomi): il razionale di questo approccio è la selezione dei pazienti a rischio di sviluppare malattia da HCMV, essendo già presente la positività per HCMV-DNA. Questo permetterebbe di esporre al rischio di tossicità da farmaci solo i pazienti realmente a rischio di malattia, ottimizzando il rapporto costo-beneficio e riducendo la comparsa di resistenze.
- c) terapia della malattia da HCMV: L'obiettivo dei precedenti approcci terapeutici è la riduzione al minimo della necessità di trattare malattie conclamate da HCMV, evitando che si sia già instaurato un danno d'organo, più difficilmente reversibile con la terapia antivirale.

L'armamentario terapeutico a disposizione attualmente si limita a poche molecole:⁴⁶

- ganciclovir
- valganciclovir (pro farmaco di ganciclovir)
- foscarnet
- cidofovir
- fomivirsen.

È recentemente stato proposto l'utilizzo di acyclovir ad alte dosi e valaciclovir nel trattamento profilattico nei soggetti trapiantati, ma il loro utilizzo per ora non trova indicazione nel trattamento della malattia attiva. Per il momento non esistono farmaci approvati per il trattamento dell'infezione congenita da HCMV. Con l'unica eccezione di fomivirsen (un oligonucleotide antisense specifico per il locus genico di HCMV Major Immediate-Early), tutti gli altri farmaci hanno come bersaglio diretto o indiretto la DNA polimerasi virale.

Questi farmaci (salvo il valganciclovir) hanno una bassa biodisponibilità orale che impone una somministrazione endovenosa per garantire l'efficacia terapeutica. Inoltre sono gravati da un profilo di sicurezza non ottimale, sia nel breve termine (nefrotossicità, mielotossicità) che nel lungo termine (diminuzione della capacità riproduttiva e possibile carcinogenicità). L'emergenza di ceppi virali resistenti ai trattamenti è di particolare preoccupazione, data la parziale sovrapposibilità nei meccanismi di azione di questi farmaci che rende quindi frequente lo sviluppo di resistenze multiple.

2.b. Le malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI)

2.b.1. Caratteristiche cliniche

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI) sono disordini cronici di natura infiammatoria che colpiscono il tratto gastrointestinale con un andamento clinico caratterizzato dall'alternanza di periodi di benessere (remissione) e di periodi di riattivazione dei sintomi (riaccensioni). Fanno parte di questa famiglia la malattia di Crohn (MC) e la colite ulcerosa (CU).

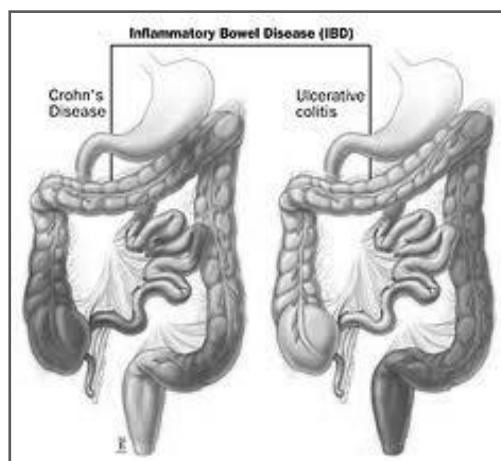


Figura 3: Localizzazione delle MICI (MC e CU). Immagine tratta da <http://www.hopkins-gi.org>.

Le due patologie, pur facendo parte della stessa famiglia, hanno alcuni elementi che le contraddistinguono: la MC può colpire qualsiasi tratto del canale alimentare in maniera segmentaria, con interessamento a tutto spessore della mucosa e prevalente coinvolgimento dell'ileo terminale e del colon. Presenta una marcata eterogeneità clinica, riconducibile alla sede, estensione e fenotipo (puramente infiammatorio, oppure stenotico o fistolizzante). Sintomi tipici sono la diarrea, il dolore addominale e il calo ponderale a decorso tipicamente cronico intermittente, con tendenza alla recidiva dopo l'intervento chirurgico di resezione intestinale. La CU interessa per definizione solamente il colon, con lesioni superficiali della parete intestinale (che non oltrepassano la sottomucosa) ma che tendono ad estendersi in modo continuo in senso prossimale a partire dal retto fino a coinvolgere l'intero colon. Sintomo di frequente riscontro è il sanguinamento rettale e le complicanze più temibili, anche se non frequenti, sono lo sviluppo di megacolon tossico e la degenerazione neoplastica. L'intervento chirurgico di colectomia totale rappresenta la terapia definitiva di questa patologia.

2.b.2 Principi di patogenesi

È universalmente accettato che entrambe le patologie abbiano una patogenesi multifattoriale, in cui ciascun fattore non è in grado singolarmente di indurre e mantenere il processo morboso. Si ritiene inoltre che sia il differente peso relativo di ciascuno di questi fattori a dare luogo ai molteplici fenotipi con cui queste malattie si manifestano.

Tali fattori sono (Figura 4):⁴⁷

- 1) Predisposizione genetica
- 2) Fattori ambientali
- 3) Alterazioni del microbiota intestinale
- 4) Aberrazioni a carico di immunità innata e adattativa.

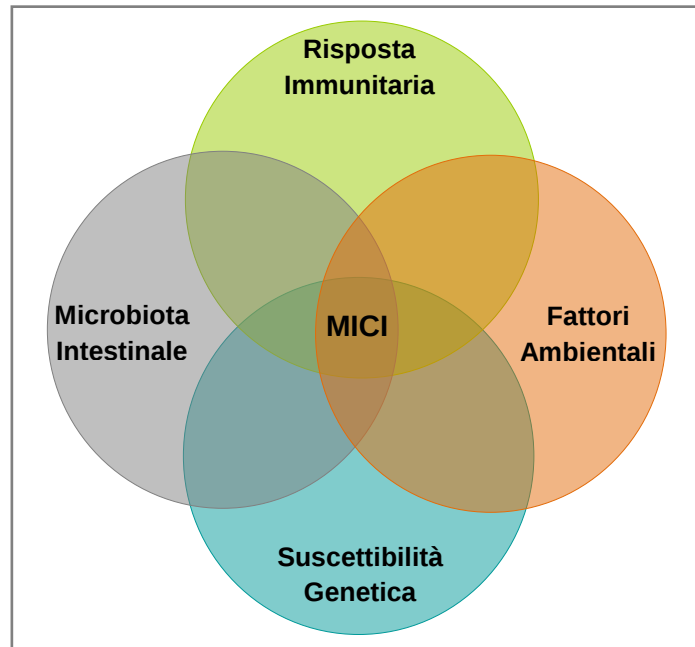


Figura 4: Fattori che intervengono nella patogenesi delle MICI.

L'ipotesi che nella patogenesi delle MICI possa essere coinvolto un agente infettivo è stata presa in considerazione fin dalla prima descrizione dell'enterite regionale nel 1913 (ora nota come MC), mettendola in relazione alla tubercolosi.⁴⁸⁻⁵⁰ Più di recente, l'incremento di incidenza e prevalenza particolarmente a carico dei paesi occidentali e l'osservazione che individui provenienti da aree a bassa incidenza migranti verso paesi occidentali acquisiscono un rischio aumentato di MICI fanno supporre che l'ambiente e lo stile di vita giochino un ruolo determinante nello sviluppo della malattia.⁵¹⁻⁵³ Si ritiene che la composizione microbica commensale nell'intestino dei soggetti da MICI sia differente da quella della popolazione generale e che funga da persistente stimolo antigenico nei confronti del compartimento immune stanziato nella mucosa intestinale.^{54,55} Questi fattori si inseriscono in un contesto immunologico disregolato, geneticamente predeterminato. Ciò che si osserva nelle MICI è uno sbilanciamento sia nel compartimento dell'immunità innata che in quello dell'immunità adattativa.⁴⁷ Di particolare interesse nella patogenesi delle MICI è il ruolo dell'immunità adattativa mediata dalle cellule T, identificando un pattern preferenzialmente Th1 nella MC e Th2

nella CU; negli ultimi anni tuttavia il riconoscimento di un ruolo decisivo da parte di un nuovo subset di cellule T (Th17), coinvolto nello sviluppo sia della MC che della CU, ha in parte sovvertito nuovamente le conoscenze sul ruolo dell'immunità cellulo-mediata nelle MICI.^{47,56} In figura 5 sono schematicamente rappresentati i principali pattern citochinici coinvolti nelle MICI.

Non meno significativi sono anche i macrofagi, mediatori dell'immunità innata, che nelle MICI risultano possedere un fenotipo attivato e particolarmente eterogeneo.⁴⁷

Si tratta pertanto di patologie in cui agenti esterni ed interni all'organismo interagiscono in una complessa rete di relazioni, per le quali non è ancora stato identificato il *primum movens*.

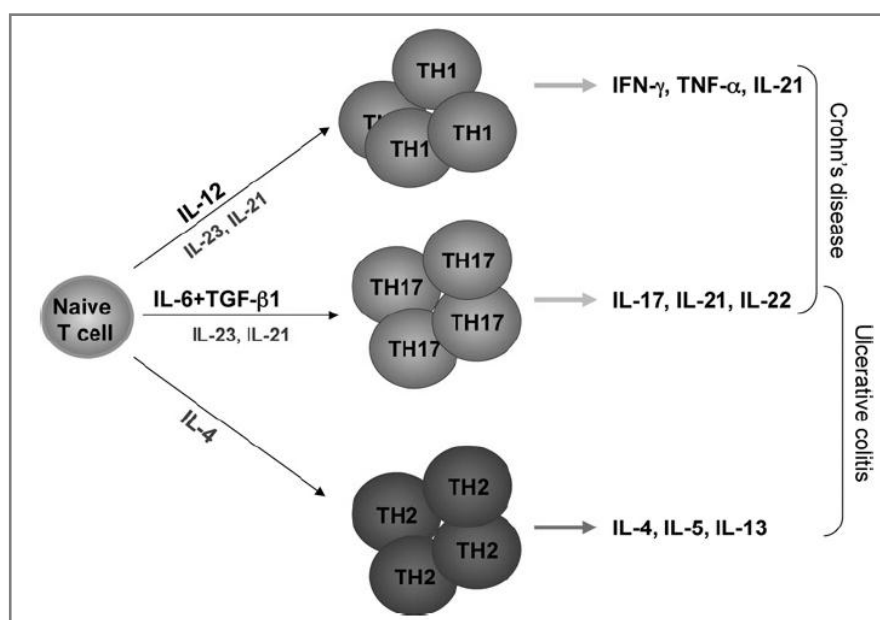


Figura 5: Profilo di secrezione citochinica nelle MICI. Tratto da Monteleone e Caprioli Clin Sci (Lond). 2010.⁵⁶

2.b.3. Principi di terapia

In assenza di una nota causa, la terapia delle MICI è volta essenzialmente al controllo dei sintomi, quando la malattia è in fase di acuzie, e alla prevenzione delle recidive e dell'evoluzione del danno d'organo, quando la malattia è in fase di remissione.^{57,58} Ci si avvale pertanto di farmaci anti-infiammatori o immunosoppressori a seconda della fase e della storia naturale della malattia.

I corticosteroidi (sia per via orale che parenterale) sono impiegati per il trattamento delle fasi di attività moderate-severe e non trovano spazio come terapia di mantenimento della remissione, anche in considerazione del basso profilo di sicurezza.

Nelle forme ad attività più moderata si può ricorrere a formulazioni a bassa biodisponibilità, come beclometasone e budesonide, che esplicano un'azione topica a livello della mucosa intestinale, limitandone gli effetti sistemici. Il razionale dell'utilizzo degli steroidi si fonda sulla loro abilità di inibire la risposta immunitaria e di conseguenza infiammatoria, interferendo con la traslocazione nucleare del fattore di trascrizione NF- κ B, impedendo così la sintesi di numerosi mediatori solubili.

Altra categoria di farmaci di diffuso impiego nelle MICI, in particolar modo nell'induzione e nel mantenimento della remissione nelle forme lievi-moderate di CU, sono gli aminosalicilati (salazopirina e mesalazina); essi interferiscono con la cascata infiammatoria inibendo gli enzimi ciclossigenasi e 5-lipossigenasi, responsabili di metabolizzare l'acido arachidonico.

Nelle forme di MICI con frequenti ricadute e che richiedano il frequente ricorso ai corticosteroidi per il controllo dei sintomi è indicato passare a farmaci immunosoppressori. Le tiopurine (azatioprina e 6-mercaptopurina) sono le molecole di più largo uso per il mantenimento della remissione sia nella MC che nella CU; l'utilizzo del metotrexate è più limitato e spesso indicato in caso di MC con concomitanti fenomeni infiammatori articolari. L'utilizzo della ciclosporina trova spazio solo per indurre la remissione nelle forme di CU acuta severa non responsiva al trattamento con corticosteroidi per via endovenosa; non è invece indicata nel mantenimento della remissione.

Gli antibiotici (ciprofloxacina e metronidazolo) trovano spazio per lo più nel trattamento delle complicanze, in particolar modo nella MC a fenotipo fistolizzante.

Nell'ultimo decennio sono stati approvati anche per le MICI i farmaci biologici, già ampiamente utilizzati nelle patologie infiammatorie di pertinenza reumatologica. Si tratta di anticorpi monoclonali diretti contro specifici target della cascata infiammatoria, in particolare in commercio sono disponibili anti-TNF- α , infliximab (registrato sia per il trattamento della CU che della MC) e adalimumab (disponibile per il momento solo per il trattamento della MC). Tali trattamenti sono farmaci di terza linea, riservati alle forme di MICI ad andamento più aggressivo e poco responsive ai trattamenti convenzionali. Si tratta di farmaci capaci di modulare il sistema immunitario e che possono associarsi ad un aumentato rischio infettivo. In particolare, le linee guida nazionali ed europee impongono un accurato screening per escludere la presenza di infezioni latenti (specie tubercolosi ed epatite B) che potrebbero riattivarsi una volta iniziato il trattamento.^{59,60}

2.c. HCMV e MICI

L'infiammazione cronica derivante dalla patologica disregolazione della risposta immunitaria nelle MICI (ma anche in altre malattie autoimmuni, come ad esempio l'artrite reumatoide, la malattia di Sjögren e il lupus eritematoso sistemico⁶¹⁻⁶³) potrebbe rappresentare un ambiente ideale per la riattivazione di HCMV, presente in forma latente nei monociti circolanti.³

La letteratura scientifica che valuti la possibile associazione tra HCMV e MICI è costituita soprattutto da case reports e case series e la maggior parte dei dati proviene perlopiù da studi retrospettivi su casistiche di pazienti limitate e spesso utilizzando differenti metodiche per la ricerca dell'infezione.⁶⁴ Queste segnalazioni provenienti dalla pratica clinica hanno sollevato il sospetto che i pazienti con MICI in fase attiva siano più suscettibili all'infezione/riattivazione virale. Resta tuttavia da stabilire se la presenza del virus in queste patologie rappresenti solamente un epifenomeno o giochi invece un ruolo nella progressione della malattia di base o se possa addirittura fungere da trigger eziopatogenetico. Quest'ultima ipotesi è stata pressoché abbandonata negli ultimi anni, soprattutto in considerazione della discrepanza tra l'ampia diffusione dell'infezione da HCMV e la significativamente più modesta prevalenza delle MICI. È tuttavia noto che l'infezione da HCMV è in grado di indurre fenomeni di autoimmunità, attraverso molteplici meccanismi.^{3,65} Le cellule infettate da HCMV producono un pannello di citochine e chemochine (ad esempio TNF- α , interleuchina 1 beta (IL-1 β), IL-6, IL-8, transforming growth factor beta (TGF- β)) che possono fungere da innesco alla cascata infiammatoria; inoltre, i peptidi virali possono dare luogo a fenomeni di mimetismo molecolare con attivazione dei linfociti T in risposta a peptidi "self";⁶⁶ infine è stata dimostrata la capacità di HCMV di indurre la produzione di autoanticorpi diretti contro l'antigene CD13.⁶⁷⁻⁶⁹ In figura 6 sono riassunti alcuni dei meccanismi coinvolti nella relazione tra HCMV e patologie autoimmuni. In aggiunta, Verdonk e colleghi avevano osservato che pazienti sottoposti a trapianto epatico per colangite sclerosante primitiva ed epatite autoimmune, patologie di per sé associate con maggior frequenza alle MICI, in caso di infezione da HCMV nel post-operatorio avevano un rischio aumentato di sviluppare riaccensione della malattia intestinale, se già precedentemente diagnosticata, ma in particolar modo una MICI *de novo*.⁷⁰

HCMVs possible role in autoimmune diseases

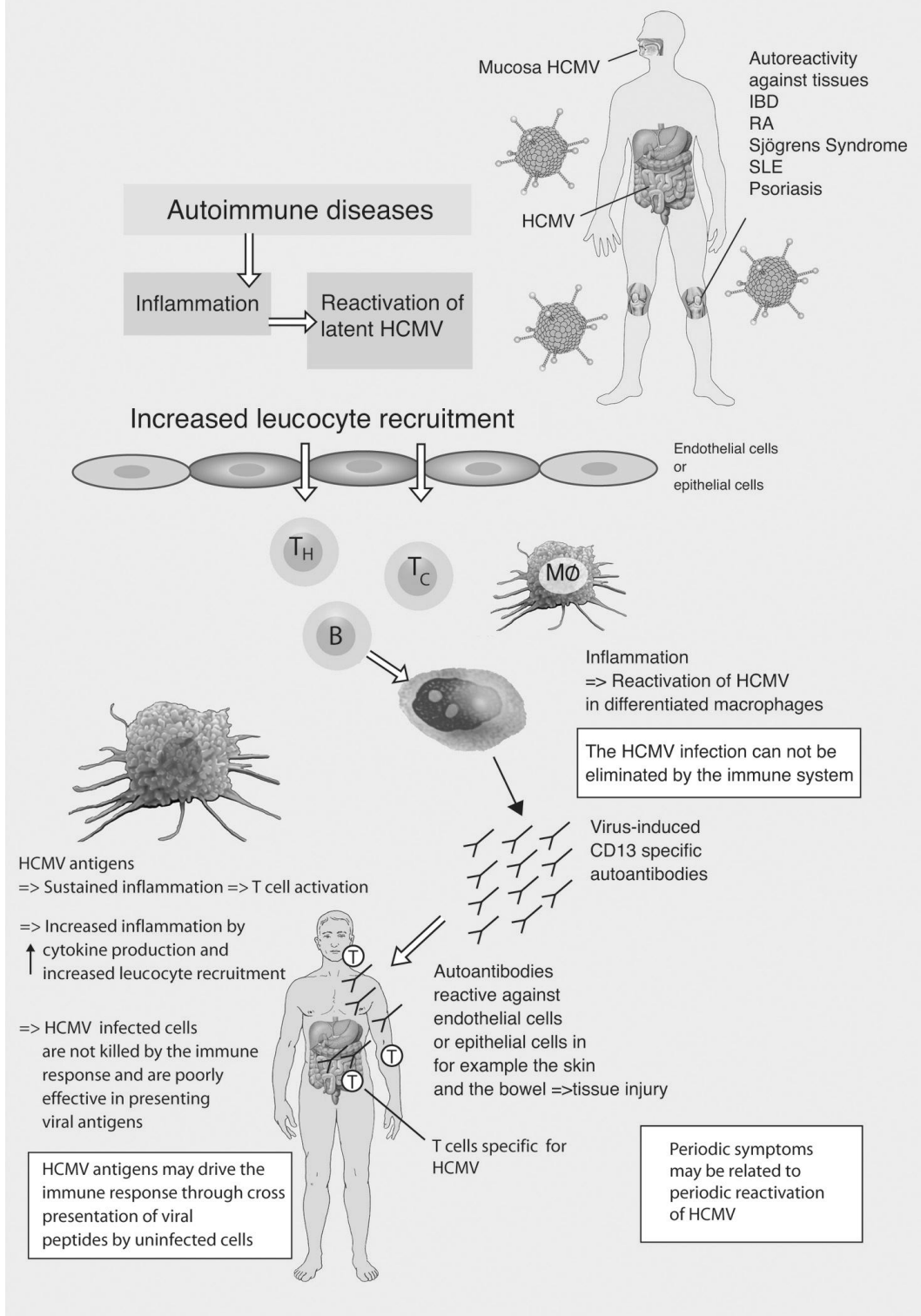


Figura 6: Possibile relazione tra patologie autoimmuni e HCMV. Tratto da Söderberg-Nauclér C. J Intern Med. 2006.³

La prevalenza dell'infezione attiva da HCMV nei soggetti affetti da MICI è di difficile stima, in considerazione delle differenti metodiche utilizzate e delle differenti popolazioni di pazienti studiate. Essa può variare dal 21.4% dello studio di Criscuoli ⁷¹ (in cui venivano studiati pazienti ricoverati per CU severa mediante antigenemia pp65, esame istologico e IHC su biopsie del retto) al 56.7% dello studio di Yoshino ⁷² (in cui l'utilizzo di RT-PCR quantitativa su mucosa colica di 30 pazienti con CU refrattaria alla terapia immunosoppressiva era significativamente più sensibile dell'analisi istopatologica in H&E e con IHC e dello studio dell'antigenemia pp65).

Le tecniche impiegate per la ricerca di HCMV modificano significativamente la capacità di porre diagnosi e rimangono inoltre da stabilire eventuali valori soglia da considerare patologici. Il gruppo di studio svedese di Söderberg-Nauclér ritiene che la presenza di una microinfezione da HCMV, ovvero la presenza di infezione attiva ma con bassi livelli di carica virale, identificabile solo con protocolli di IHC ad alta sensibilità, potrebbe di per sé avere un ruolo nel mantenimento e nella progressione dell'infiammazione.^{73,74} Utilizzando tali metodiche il riscontro del virus nelle sedi infiammate di mucosa intestinale di pazienti con MICI raggiungeva circa il 90% dei casi studiati.⁷⁵

Il significato clinico di una riattivazione virale in corso di riaccensione di MICI è ancora del tutto incerto. Lo studio di 69 pazienti con UC in fase di attività moderata-severa trattati con steroidi sistemici e/o immunosoppressori ha rilevato che circa la metà dei pazienti sieropositivi per HCMV andava incontro ad una riattivazione virale (studiata mediante monitoraggio dell'antigenemia o PCR su sangue).⁷⁶ Tuttavia l'outcome finale (tasso di remissione e di colectomia) non era influenzato dalla presenza o meno dell'infezione e nella maggior parte dei casi i due test si negativizzavano spontaneamente senza l'utilizzo di alcuna terapia antivirale. Al contrario la rivalutazione di Papadakis, seppur retrospettiva, di 10 pazienti con infezione da HCMV dimostrava la pronta risposta alla terapia antivirale e alla sospensione della terapia immunosoppressiva e/o steroidea in corso, suggerendo un ruolo diretto del virus nella riaccensione e nel peggioramento del decorso della malattia intestinale.⁷⁷ Per Maconi e colleghi invece il frequente riscontro di HCMV nei pezzi operatori di colectomia sarebbe da ricondurre alla riattivazione virale conseguente alla terapia steroidea in corso e non sarebbe quindi il virus ad essere *in primis* responsabile della steroido-refrattarietà.⁷⁸ Più di recente Roblin et al. hanno studiato prospetticamente 42 pazienti ospedalizzati per CU moderata-severa trattata con steroidi per via endovenosa ricercando la presenza di HCMV nelle biopsie intestinali e valutandone la carica mediante RT-PCR.⁷⁹ Il riscontro del virus e in particolare il numero di copie era predittivo della

mancata risposta al trattamento steroideo e a 3 linee di trattamento successive; l'introduzione della terapia antivirale nei pazienti che avessero fallito almeno 2 linee di trattamento permetteva di ottenere la negativizzazione della PCR per HCMV ad un successivo controllo endoscopico e di raggiungere la remissione clinica. Lo studio prospettico multicentrico condotto su 72 pazienti ricoverati per riaccensione moderata-severa di CU e trattati con steroidi per via endovenosa ha messo in luce l'efficacia della terapia antivirale con gancyclovir nell'indurre la remissione di malattia nei pazienti steroideo-resistenti; nei pazienti che invece avevano risposto prontamente alla terapia steroidea il riscontro di HCMV non aveva modificato il decorso clinico in senso sfavorevole e non era stato necessario impostare terapia antivirale.⁸⁰

L'utilizzo di anticorpi monoclonali anti-TNF- α (infliximab e adalimumab) per il trattamento di forme moderate-severe di MICI è ormai consolidato e il rischio di potenziali infezioni opportunistiche è noto. C'è incertezza tuttavia sul profilo di sicurezza di questi trattamenti immunomodulatori, in particolare in relazione al rischio di riattivazione di virus cronici e le linee guida europee proposte per la prevenzione, diagnosi e gestione di tali infezioni non sono ampiamente diffuse nella normale pratica clinica.^{60,81} Solamente due studi hanno valutato nello specifico il rischio di riattivazione di HCMV nel corso del trattamento con anti-TNF- α per MICI. Il gruppo di Torino ha valutato in 60 pazienti con MC il rischio di riattivazione HCMV, oltre che di JC-poliomavirus (JCV), Epstein-Barr virus (EBV), Human Herpes Virus (HHV) -6, -7 e -8, nell'arco delle prime 14 settimane di trattamento con infliximab, senza osservare la comparsa di genoma virale in circolo (se non solo in forma transiente per EBV nel 7% dei pazienti).⁸² Anche dallo studio del gruppo di Roma sono emersi dati rassicuranti, seppur su un campione di pazienti significativamente più modesto (11 pazienti con MC e 4 pazienti con CU);⁸³ infatti l'infezione da HCMV non è risultata condizionare il successivo outcome clinico dei pazienti sottoposti a protocollo di induzione con infliximab. In questo caso tuttavia i pazienti erano stati studiati mediante test di antigenemia (1 caso positivo) e ricerca del genoma virale (3 casi positivi) e IHC (nessun caso positivo) su mucosa intestinale. Sulla base di tutte queste considerazioni è stato quindi di recente proposto l'algoritmo diagnostico e terapeutico rappresentato in figura.⁸⁴ Allo stato attuale questa rimane tuttavia solo una proposta di management del paziente con MICI e infezione da HCMV che necessita di opportuna validazione in ambito clinico.

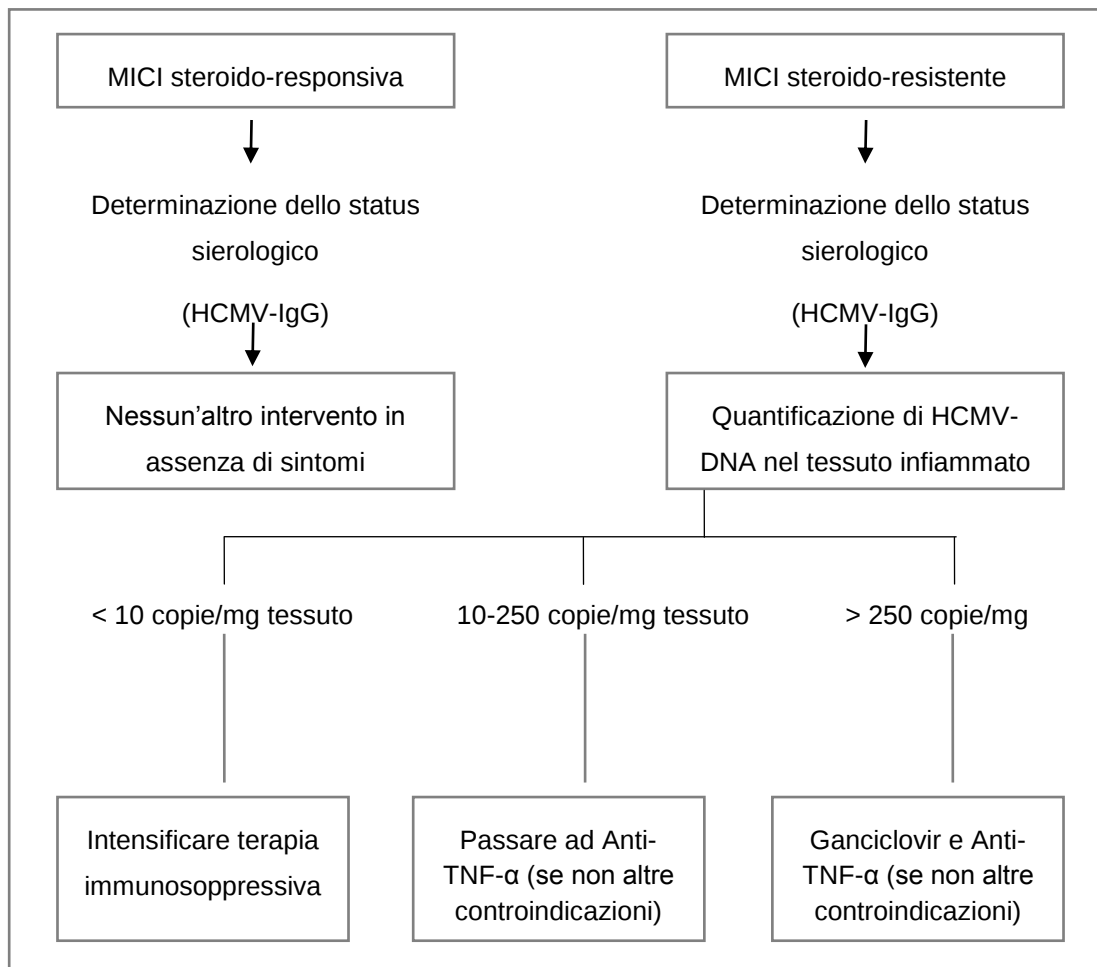


Figura 7: Proposta di algoritmo diagnostico terapeutico dell'infezione da HCMV nei pazienti con MICI secondo Pillet S. et al. Dig Liv Dis 2012.⁸⁴

3. SCOPO

Gli scopi dello studio sono:

- 1) valutare la frequenza di microinfezione (infezione di basso grado) da HCMV e il tipo di infezione (attiva *versus* latente) nella mucosa intestinale di pazienti affetti da MICI, in relazione alla presenza di infiammazione endoscopica e istologica e al trattamento medico in corso (immunosoppressione *versus* non-immunosoppressione);
- 2) valutare i livelli di immunità cellulare T HCMV-specifica nei soggetti con MICI (e quindi la predisposizione ad una possibile riattivazione virale), in relazione all'attività clinica di malattia e al tipo di trattamento medico in corso (immunosoppressione *versus* non-immunosoppressione).

4. PAZIENTI, MATERIALI E METODI

Lo studio si è articolato in due parti distinte:

4.a. Studio retrospettivo della frequenza di microinfezione da HCMV in biopsie intestinali

4.a.1. Pazienti

Sono stati inclusi nello studio soggetti consecutivi, non selezionati, afferenti al servizio di endoscopia digestiva dell'unità operativa di gastroenterologia dell'Azienda Ospedaliera – Università di Padova affetti da MICI (sia MC che CU) in normale follow-up endoscopico per la malattia intestinale e soggetti di controllo che avevano eseguito colonscopia per screening del cancro coloretale o per sintomi gastrointestinali, senza riscontro tuttavia di alcuna lesione organica all'endoscopia e all'istologia.

Sono state analizzate le biopsie intestinali prelevate per normale pratica clinica e conservate, dopo opportuna fissazione in formalina ed inclusione in paraffina, presso l'Istituto di Anatomia Patologica.

Di tali soggetti sono stati raccolti i dati anagrafici e clinici (in forma anonimizzata) già presenti nelle cartelle ambulatoriali per mezzo di un'apposita scheda cartacea di raccolta dati (età, sesso, diagnosi di malattia, attività di malattia, attività endoscopica e istologica, terapia medica in corso al momento dell'endoscopia).

4.a.2. Immunoistochimica (IHC)

Dalle biopsie intestinali prelevate in corso di endoscopia per normale pratica clinica e fissate in formalina e successivamente incluse in paraffina sono state eseguite sezioni dello spessore di 6 µm. Dopo una prima fase di deparaffinazione mediante immersione in xilene, ciascun vetrino è stato reidratato attraverso una serie di alcoli dal 99.5% al 70% per 5 minuti ciascuno e successivamente lavato in TBST (Tris-buffered saline with Tween 20). Dopo trattamento in formaldeide neutra tamponata (NBF) al 4% per 30 minuti e dopo opportuno lavaggio in TBST, ciascuna biopsia è stata sottoposta a digestione enzimatica con pepsina a 37°C per 3 minuti (Biogenex). Per la fase di smascheramento degli antigeni le biopsie sono state poi incubate in Citra Buffer pre-riscaldato a 90°C per 3 minuti e successivamente a 37°C per 16 ore (overnight). I successivi passaggi per il blocco di eventuali segnali aspecifici prevedeva l'incubazione con H₂O₂ (Merck) al 3% per 15 minuti in ambiente buio e a seguire, dopo opportuno lavaggio in TBST nel passaggio da un'incubazione all'altra, 30 minuti di incubazione con avidina, biotina (DakoCytomation), Fc receptor blocker e background buster

(Innovex Biosciences). È stato infine applicato l'anticorpo monoclonale murino diretto contro i seguenti antigeni di HCMV:

- immediate-early (IEA; clone 8B1.2; Chemicon International; isotipo IgG2) diluito 1:300
- pp65 (cloni 2 and 6, IgG1; Novocastra Laboratories) diluito 1:100

Come controllo positivo è stato utilizzato un anticorpo diretto contro α -actina del muscolo liscio, isotipo IgG2 (BioGenex) oppure diretto contro Von Willebrand Factor, isotipo IgG1 (Merck); come controllo negativo si è utilizzato un anticorpo IgG1 anti-troponina C (Sigma-Aldrich). L'incubazione è avvenuta a 4°C per 16 ore (overnight).

Dopo opportuno lavaggio in TBST i vetrini sono stati incubati con anticorpo murino secondario biotinilato (Biogenex) alla diluizione di 1/18 per 45 minuti a temperatura ambiente. L'incubazione successiva con streptavidina coniugata a perossidasi è avvenuta nelle medesime condizioni.

Lo sviluppo di ciascuna reazione è stato eseguito manualmente in corso di osservazione al microscopio ottico utilizzando come cromogeno diaminobenzidina (DAB) (Innovex Biosciences). Dopo counterstaining con ematossilina (Merck) i vetrini sono stati montati con Permanent Mounting Medium (Permount).

I livelli di infezione da HCMV sono stati classificati in relazione al numero di cellule positive all'IHC:

- negativo
- positivo
 - bassi livelli (< 25%)
 - moderati livelli (25-50%)
 - elevati livelli (> 50%)

4.a.3. Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) per HCMV Immediate Early (IE) DNA

Il DNA è stato estratto dalle sezioni paraffinate utilizzando PicoPure DNA Extraction Kit (Life Technologies) secondo le istruzioni del produttore. I livelli del gene IE di HCMV sono stati valutati utilizzando un saggio di espressione TaqMan utilizzando i seguenti primer: forward primer - 5' GTGACCCATGTGCTTATGACTCTAT 3'; reverse primer - 5' CTCAACATAGTCTGCAGGAACGT 3' (Life Technologies). La reazione RT-PCR è stata condotta utilizzando ABI Prism 7900HT e le successive analisi dei risultati

eseguite utilizzando l'apposito software SDS 2.3. Tutti i campioni sono stati normalizzati ai livelli di espressione di ribonucleasi P (Life Technologies). Le reazioni sono sempre state condotte in triplicato per valutare la riproducibilità dei dati ottenuti. Il DNA estratto da fibroblasti in coltura (MRC5) e infettati con il ceppo di CMV AD169 è servito da controllo positivo; le reazioni condotte senza l'aggiunta di DNA template sono servite da controllo negativo (al suo posto si è utilizzata H₂O milliQ). La reazione di amplificazione è stata eseguita in una piastra con 96 pozzetti separati. Per facilitare la rappresentazione grafica i risultati sono stato moltiplicati per 10⁶.

4.a.4. Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) per HCMV miRNA UL112

Dopo avere rimosso la paraffina dalle sezioni l'RNA totale è stato estratto mediante mirVanaTM miRNA Isolation Kit (Ambion), secondo le istruzioni del produttore. L'RNA è servito da stampo per la sintesi di cDNA, mediante TaqMan[®] miRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) e successivamente l'espressione dello specifico miRNA di HCMV UL112 è stata valutata mediante TaqMan[®] miRNA Assay, utilizzando lo specifico primer (Life Technologies; sequenza: AAGUGACGGUGAGAUCCAGGCU). RNU6B è stato utilizzato come reference gene (sequenza: CGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCATATTTTT). La reazione RT-PCR è stata condotta utilizzando ABI Prism 7900HT e le successive analisi dei risultati eseguite utilizzando l'apposito software SDS 2.3. Le reazioni sono sempre state condotte in triplicato per valutare la riproducibilità dei dati ottenuti. L'RNA estratto da fibroblasti in coltura (MRC5) e infettati con il ceppo di CMV AD169 è servito da controllo positivo; le reazioni condotte senza l'aggiunta di template (al suo posto si è utilizzata H₂O milliQ) sono servite da controllo negativo. La reazione di amplificazione è stata eseguita in una piastra con 96 pozzetti separati. Per ciascuna reazione è stato utilizzato un volume finale pari a 10 µl. Per facilitare la rappresentazione grafica i risultati sono stato moltiplicati per 10³.

4.b. Parte prospettica per lo studio dell'immunità cellulare T HCMV specifica

4.b.1. Pazienti

Sono stati arruolati nello studio in maniera prospettica e consecutiva pazienti affetti da MICI (sia MC che CU) afferenti agli ambulatori, al servizio di day hospital e al reparto di degenza della struttura operativa complessa di gastroenterologia dell'Azienda Ospedaliera – Università di Padova.

1. Livello di benessere generale nel corso dell'ultima settimana?	Pts
☐ Buono	0
☐ Lievemente compromesso	1
☐ Compromesso	2
☐ Molto compromesso	3
☐ Terribile	4
2. Dolore addominale nell' ultima settimana?	
☐ No	0
☐ Lieve	1
☐ Moderato	2
☐ Severo	3
3. Scariche con feci liquide nell'ultima settimana	
☐ No	0
☐ Sì	Se sì, quante al giorno? (inserire il numero)
4. Massa addominale alla visita odierna?	
☐ No	0
☐ Dubbia	1
☐ Definita	2
☐ Definita e dolorosa	3
5. Manifestazioni extraintestinali (indicare tutte le condizioni presenti)	
☐ Dolori articolari	1
☐ Irite/uveite/episclerite	1
☐ Eritema nodoso	1
☐ Pioderma gangrenoso	1
☐ Ulcere aftoidi	1
☐ Fissurazioni anali	1
☐ Fistole attive	1
☐ Ascessi addominali o perianali	1
Tot: _____	

Figura 8: HBI per la valutazione dell'attività clinica della MC.

1. Numero di scariche liquide o soffici	Pts
☐ 1-2 scariche al giorno	0
☐ 3-4 scariche al giorno	1
☐ 5-6 scariche al giorno	2
☐ 7-9 scariche al giorno	3
☐ 10 o più scariche al giorno	4
2. Le è capitato, negli ultimi tre giorni, di doversi svegliare di notte o la mattina presto per scaricare?	
☐ No	0
☐ Sì	1
3. Le è capitato di trovare sangue nelle feci negli ultimi tre giorni?	
☐ No	0
☐ Occasionalmente	1
☐ Una volta sì e una no	2
☐ Ad ogni scarica	3
4. Le è capitato di avere incontinenza fecale negli ultimi tre giorni?	
☐ No	0
☐ Sì	1
5. Ha provato dolore addominale negli ultimi tre giorni?	
☐ No	0
☐ Sì	
Se sì, come lo definirebbe?	
☐ Medio; avvertito ma tollerabile	1
☐ Forte; interferisce con le normali attività	2
☐ Severo; rende impossibili le normali attività	3
6. Come definirebbe il suo benessere generale nel corso degli ultimi tre giorni?	
☐ Eccellente	0
☐ Molto buono	1
☐ Buono	2
☐ Sufficiente	3
☐ Scarso	4
☐ Terribile	5
7. Ha fatto ricorso, negli ultimi tre giorni, all'uso di antidiarroeici?	
☐ No	0
☐ Sì	1
Tot: _____	

Figura 9: MTWSI per la valutazione dell'attività clinica della CU.

Dopo opportuna informazione del paziente è stato acquisito il consenso informato a partecipare allo studio e al trattamento dei dati.

Sono stati reclutati pazienti sia in fase di remissione di malattia che in riaccensione secondo gli indici di attività clinica Harvey Bradshaw Index (HBI) per la MC e Modified Truelove and Witts Severity Index (MTWSI) per la CU (Figure 8 e 9).

Lo studio si è articolato in due parti:

- una parte trasversale, in cui i pazienti sono stati stratificati sulla base dell'indice di attività clinica di malattia e sulla base della terapia medica in corso.
- una parte prospettica, in cui sono stati seguiti prospetticamente i pazienti indirizzati alla terapia con farmaci biologici (adalimumab o infliximab) eseguendo un prelievo ematico baseline e nel corso del mantenimento (a partire dalla III somministrazione di farmaco nella MC e dalla IV somministrazione di farmaco nella CU).

4.b.2. Sierologia per HCMV

Lo stato di esposizione ad HCMV è stato valutato mediante il dosaggio delle IgG, utilizzando il kit commerciale IMMULITE 2000 CMV IgG (Siemens), secondo le istruzioni del produttore. In breve, si tratta di un immunodosaggio enzimatico sequenziale in chemiluminescenza ed in fase solida, che utilizza delle sferette coattate con antigene di HCMV disattivato e parzialmente purificato (ceppo AD169 da lisati di cellule infette); in presenza di eventuali IgG presenti nel siero del paziente, queste si andranno a legare alle sferette. Successivamente viene aggiunta fosfatasi alcalina coniugata con anticorpo monoclonale murino anti-IgG umane ed infine aggiunto il substrato della fosfatasi alcalina, registrando quindi la formazione del prodotto chemiluminescente.

4.b.3. Saggio EliSpot

Lo studio quantitativo della risposta immunitaria cellulare di tipo T è stato effettuato mediante saggio EliSpot (gamma interferon enzyme-linked immunosorbent spot). Il test EliSpot si fonda sul medesimo principio del test ELISA e misura la produzione di una citochina target (IFN- γ in questo caso), indotta dopo opportuna stimolazione antigenica, mediante legame con un anticorpo primario pre-caricato su apposita piastra. Il successivo legame di un anticorpo secondario accoppiato ad un enzima e l'incubazione con opportuno substrato cromogeno viene visualizzato come un precipitato che appare come uno spot sul fondo della piastra. Il numero di spot formati è direttamente riconducibile al numero di cellule che hanno prodotto IFN- γ dopo la stimolazione antigenica. A tale scopo sono stati prelevati complessivamente 10 ml di sangue periferico in 4 provette contenenti sodio citrato, dopo opportuna informazione del paziente e acquisizione del consenso informato. Ciascun campione ematico è stato processato entro 24 ore dalla raccolta.

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) sono state estratte dal sangue intero e purificate mediante separazione con Ficoll (GE Healthcare). Le PBMCs sono state risospese in RPMI 1640 medium supplementato con albumina sierica umana al 10% (Sigma-Aldrich). Le PBMCs sono state quindi contate e successivamente seminate alla concentrazione di 1×10^6 cellule/ml in piastre da EliSpot da 96 pozzetti leganti IFN- γ (Autoimmun Diagnostika). Questa procedura garantisce che anche i campioni che presentano bassi dosaggi di cellule T presentino un numero adeguato di cellule aggiunte ai pozzetti per la microtitolazione.

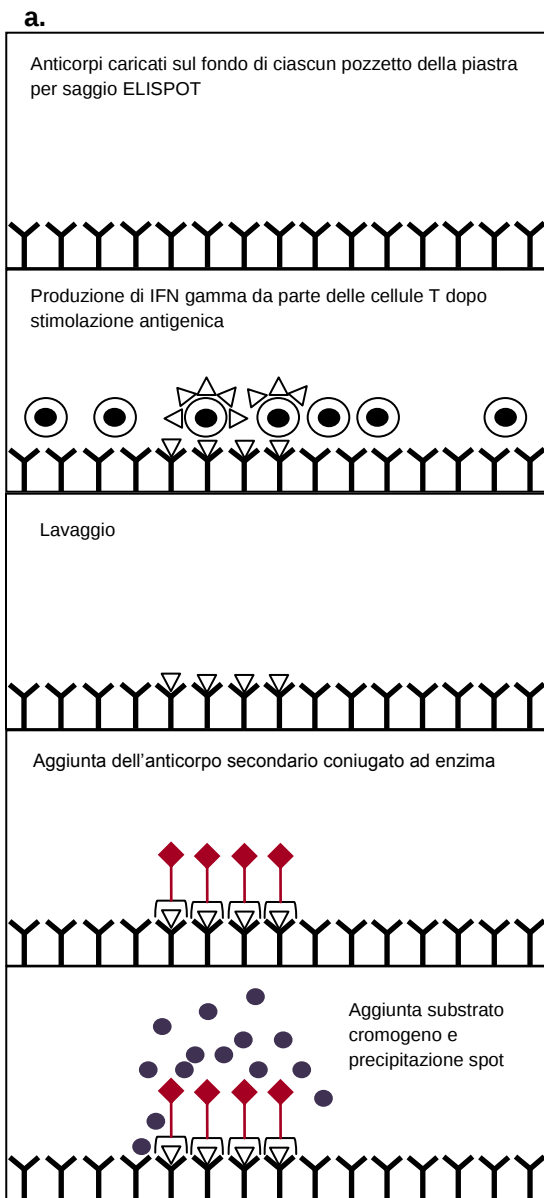
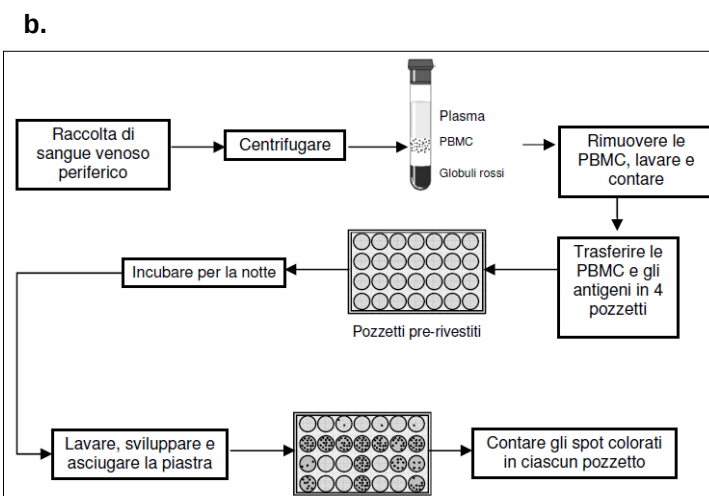


Figura 10: Rappresentazione schematica del principio del saggio ELISPOT (a) e delle principali procedure di esecuzione (b).



Per ciascun campione sono stati impiegati 4 pozzetti:

- 2 per incubazione con fitoemoagglutinina (PHA; 10 µg/ml; Autoimmun Diagnostika) o phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 50 ng/ml; Sigma-Aldrich) a ionomicina (1 µM; Sigma-Aldrich), come controlli positivi per confermare la funzionalità delle PBMC.
- 1 per incubazione con una miscela di peptidi pp65 specifici di CMV (ppUL83) (10 µg/ml; Autoimmun Diagnostika).
- 1 per incubazione con una miscela di peptidi contenenti residui aminoacidici random di pp65 (10 µg/ml), come controllo negativo per identificare una eventuale attivazione cellulare non specifica.

Le PBMCs sono state incubate con gli antigeni per almeno 16 ore (incubazione notturna) per consentire la stimolazione delle cellule T sensibilizzate eventualmente presenti. L'IFN-γ prodotto viene catturato da specifici anticorpi adesi alla base del pozzetto, mentre le cellule e gli altri materiali indesiderati vengono rimossi con un lavaggio. L'anticorpo secondario coniugato alla fosfatasi alcalina va a legarsi all' IFN-γ fissato alla base del pozzetto. Tutto il coniugato non fissato viene rimosso mediante lavaggio. L'aggiunta di un substrato solubile determina la formazione di uno spot di precipitato insolubile nel sito di reazione. Ciascuno spot rappresenta l'impronta di una singola cellula T IFN-γ-secerne, e la conta degli spot ottenuti dà la misura della quantità di cellule T effettrici sensibili ad HCMV nel sangue periferico. Le immagini delle reazioni EliSpot sono state successivamente acquisite e analizzate mediante un apposito scanner automatico (Aelvis). I risultati del saggio EliSpot sono espressi come numero di "HCMV pp65-specific IFN-γ spotforming colonies" (SFCs)/200,000 PBMCs". Per le reazioni di stimolazione antigenica è stato utilizzato il peptide pp65 in quanto considerato tra gli antigeni di HCMV maggiormente immunogenici. I risultati sono riportati dopo sottrazione del rumore di fondo del controllo negativo. I livelli di immunità sono stati suddivisi in bassi/medi/alti a seconda che il numero di SFCs fosse inferiore a 20, tra 20 e 100 o superiore a 100.

4.c. Analisi statistica

I dati sono stati inseriti in un foglio di calcolo EXCEL e le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software statistico GraphPad Prism 6. I risultati relativi alle variabili categoriali sono stati analizzati descrittivamente riportando il conteggio e la

percentuale in ciascuna categoria. Per le variabili quantitative sono stati riportati la numerosità, la mediana ed il range (valori minimo e massimo).

L'analisi di confronto tra frequenze è stata condotta mediante test χ^2 (o test di Fisher laddove opportuno). Il confronto tra medie è stato condotto mediante test di Mann-Whitney per campioni indipendenti (o Kruskal Wallis laddove opportuno). Lo studio della relazione tra livelli di immunità HCMV specifica e le variabili in esame è stato condotto mediante t test. Il livello di significatività statistica è stabilito a 0.05.

5. RISULTATI

Nello studio retrospettivo volto a valutare la prevalenza della microinfezione da HCMV sono stati inclusi complessivamente 32 pazienti con MICI e 8 soggetti di controllo. Le caratteristiche demografiche della popolazione studiata sono riportate in Tabella 1. Sono state studiate mediante IHC complessivamente 116 biopsie intestinali raccolte nel corso di 55 esami endoscopici diversi; sono state pertanto analizzate una media di 2.9 biopsie/paziente. In Tabella 1 è riportato il regime terapeutico dei pazienti al momento dell'endoscopia. Nessuno dei pazienti di controllo era affetto da copatologie che richiedessero terapia immunosoppressiva.

Tabella 1: Caratteristiche della popolazione in studio

POPOLAZIONE ARRUOLATA	TOTALE	MC	CU	CONTROLLI
Numero pazienti	40	11	21	8
Maschi (n° pazienti e %)	25 (62.5)	9 (82)	11 (52)	5 (62.5)
Femmine (n° pazienti e %)	15 (37.5)	2 (18)	10 (48)	3 (37.5)
Età (mediana e range)	39 (18-77)	33 (21-69)	35 (18-49)	63 (21-77)
Numero colonscopie	55	20	27	8
Terapia Non Immunosoppressiva	25	6	11	8
Terapia Immunosoppressiva	30	14	16	-
Biologici	15			
Tiopurine	6			
Steroidi Sistemici	2			
Altro	2			
Associazione di immunosoppressori	5			

Su 116 biopsie, 84 (72%) provenivano da mucosa infiammata, confermata sia endoscopicamente che istologicamente (Tabella 2).

Tabella 2: Distribuzione delle biopsie in base alla presenza di infiammazione mucosale

Numero biopsie valutate mediante IHC	TOTALE	MC	CU	CONTROLLI
Totale	116	40	62	14
Da mucosa infiammata	84	33	51	-
Da mucosa non infiammata	32	7	11	14

Nel complesso, nel 37.5% dei pazienti studiati (15/40) è emersa la positività antigenica ad almeno uno dei 2 antigeni di HCMV. L'IHC per l'antigene IE di HCMV ha dato esito positivo nel 43% (50 su 116) delle biopsie studiate; in 5 casi su 116 non è stato possibile stabilire con certezza il risultato dell'analisi IHC per IE (casi identificati come N.A. in figura 11 e 12). La totalità delle biopsie positive all'antigene IE di HCMV proveniva da aree di mucosa intestinale infiammata di soggetti affetti da MICI. L'IHC per l'antigene pp65 è risultata positiva nel 45% delle biopsie analizzate (52 su 116); in 3 casi non è stato possibile stabilire con certezza il risultato dell'analisi IHC per pp65 (casi identificati come N.A. in figura 11 e 12). In nessuna delle biopsie intestinali raccolte dai soggetti di controllo è stata riscontrata positività per l'antigene IE di HCMV, e solo in una biopsia è emersa una debole positività per l'antigene pp65 in poche cellule epiteliali e della lamina propria.

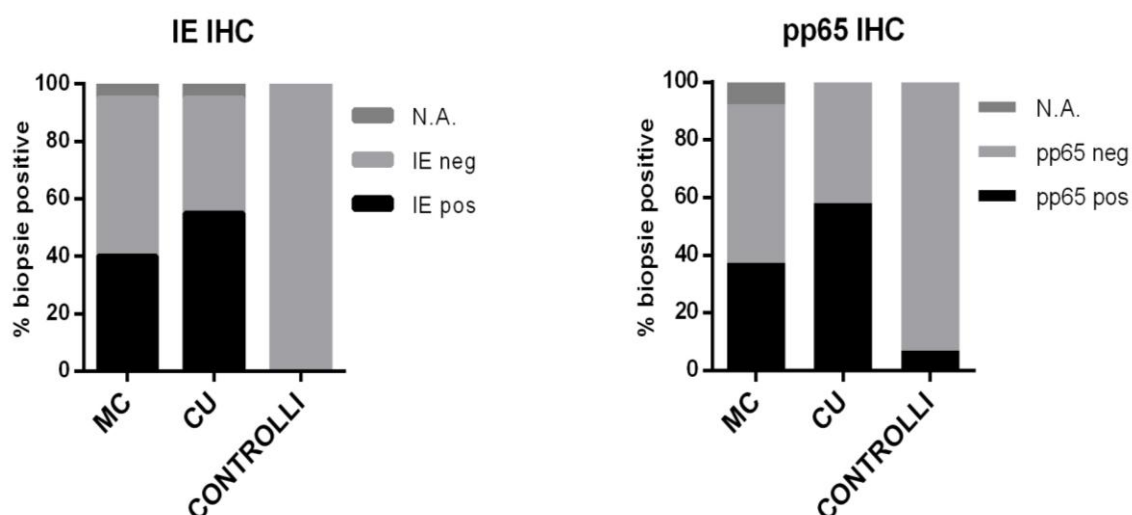


Figura 11: Risultati IHC stratificati per diagnosi.

La positività sia all'antigene IE che pp65 di HCMV è stata riscontrata più frequentemente nelle biopsie provenienti da mucosa infiammata rispetto a quelle provenienti da mucosa sana di soggetti affetti da MICI ($p < 0.000001$ e $p = 0.0013$, rispettivamente). Questa maggior frequenza è stata riscontrata anche rispetto alle biopsie intestinali provenienti dai soggetti di controllo ($p = 0.000004$ per IE e $p = 0.0003$ per pp65). Al contrario, non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa nella frequenza della positività agli antigeni di HCMV nelle biopsie provenienti dai controlli rispetto a quelle provenienti da aree di mucosa esente da infiammazione di soggetti affetti da MICI.

Nei soggetti con MC è stata riscontrata una maggior frequenza di positività antigenica per IE ($p = 0.014$), ma non per pp65 ($p = 0.437$) nelle biopsie provenienti da aree intestinali infiammate rispetto a quelle sane. Nei soggetti affetti da CU, invece, questa differenza è stata riscontrata per entrambi gli antigeni ($p = 0.00001$ per IE e $p = 0.0004$ per pp65).

Nelle biopsie infiammate dei pazienti affetti da CU è stata riscontrata la positività per gli antigeni pp65 di HCMV più frequentemente rispetto a quelle provenienti da aree infiammate di pazienti affetti da MC ($p = 0.035$); questo comportamento non è stato invece osservato nel caso dell'antigene IE.

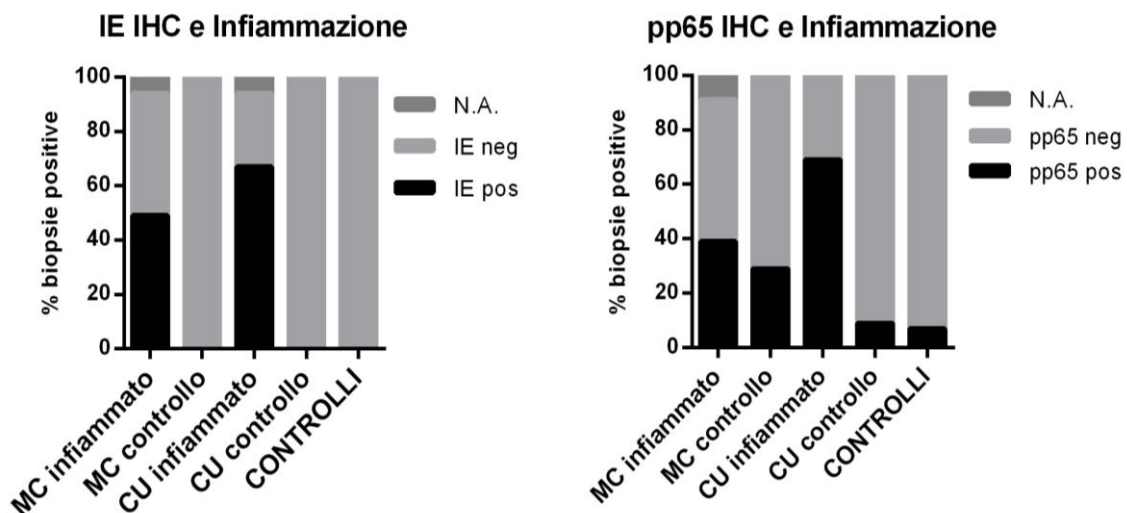


Figura 12: Risultati IHC stratificati per diagnosi e presenza di infiammazione intestinale.

In Figura 12 sono riportate le percentuali di positività per l'antigene IE e pp65 in relazione alla presenza o meno di infiammazione mucosale. In nessuna delle biopsie intestinali prelevate da aree di mucosa esenti da patologia in pazienti affetti da MC e CU (nella figura 12 indicate come MC controllo e CU controllo) è stata riscontrata la positività per antigeni IE; in 2 casi su 7 (29%) per MC controllo e 1 caso su 11 (9%) per CU controllo è stata riscontrata positività per antigene pp65.

Nella maggior parte dei casi (54% per IE e 63% per pp65) il numero di cellule positive per gli antigeni di HCMV era inferiore al 25% del totale delle cellule visualizzate nella biopsia; nel 30% e 25% dei casi rispettivamente tale conta raggiungeva il 50% del totale. Solo nel 16% e 12% delle biopsie (rispettivamente per IE e pp65) la positività cellulare per HCMV copriva più della metà della popolazione cellulare compresa nel vetrino istologico.

La presenza di terapia immunosoppressiva al momento della colonscopia non è risultata associata ad un maggior rischio di avere l'IHC positiva per l'antigene IE o pp65, sia che fosse utilizzata in monoterapia o in associazione. Dalla stratificazione dei dati secondo il tipo di immunosoppressore utilizzato (anti-TNF- α , tiopurine, steroidi sistemici) non è emersa alcuna associazione ad una maggiore positività antigenica all'IHC. Nel complesso, i soggetti affetti da MICI non immunosoppressi risultano tuttavia più frequentemente positivi rispetto ai soggetti di controllo, anch'essi non immunosoppressi ($p = 0.001$ per IE; $p = 0.007$ per pp65).

Tabella 3: Distribuzione dei risultati dell'IHC in base alla terapia medica.

	% Biopsie			
	IE pos	IE neg	pp65 pos	pp65 neg
Terapia Immunosoppressiva	49	45	31	32
Terapia Non Immunosoppressiva	35	63	41	57

In figura 13 e 14 sono riportati due esempi di IHC sia per antigeni IE che pp65 di due distinti pazienti.

Figura 13: Staining IE

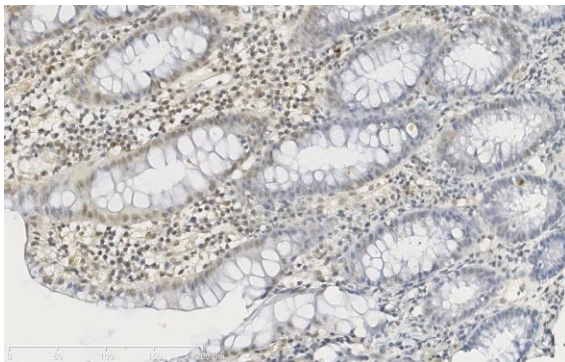
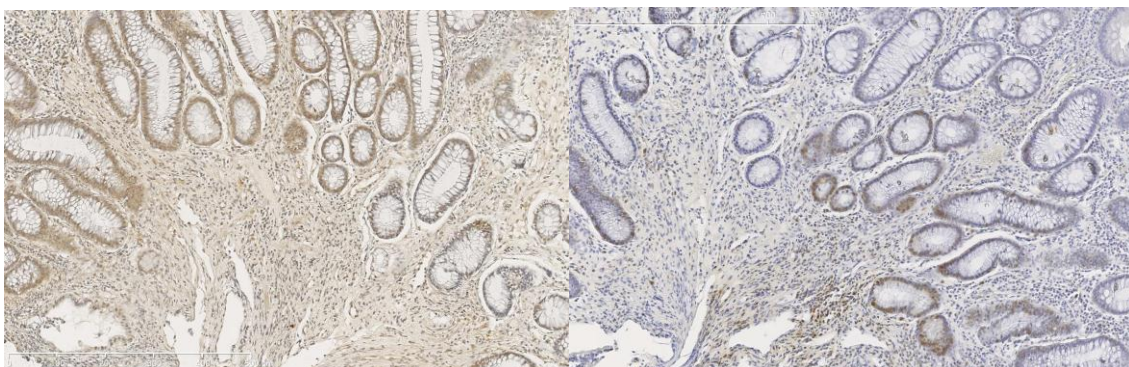
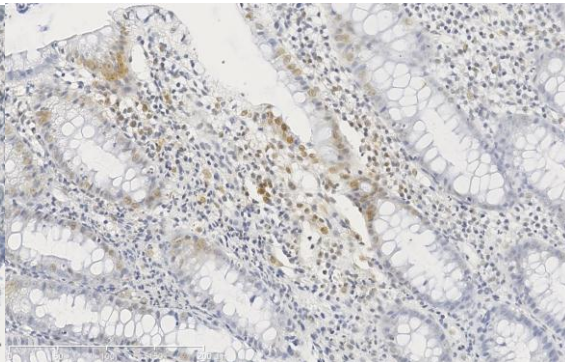


Figura 14: Staining pp65



Per ulteriore conferma del dato ottenuto all'IHC su 40 biopsie intestinali, provenienti da 30 differenti pazienti, è stato estratto il DNA ed eseguita la ricerca del genoma di HCMV mediante RT-PCR diretta contro il gene Major IE. Tale ricerca ha dato esito negativo in 26 casi (65%). Nel 70% dei casi l'esito della ricerca di DNA virale ha dato esito coerente con il risultato dell'IHC (PCR negativa con IHC negativa; PCR positiva con IHC positiva per almeno uno dei due antigeni virali). I livelli di espressione del gene IE di HCMV sono risultati essere molto inferiori rispetto allo standard di riferimento (DNA proveniente da fibroblasti infettati in coltura con CMV). Dall'analisi dei campioni positivi non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa nelle medie dei livelli di espressione del gene tra campioni provenienti da mucosa infiammata e non infiammata dei soggetti con MICI.

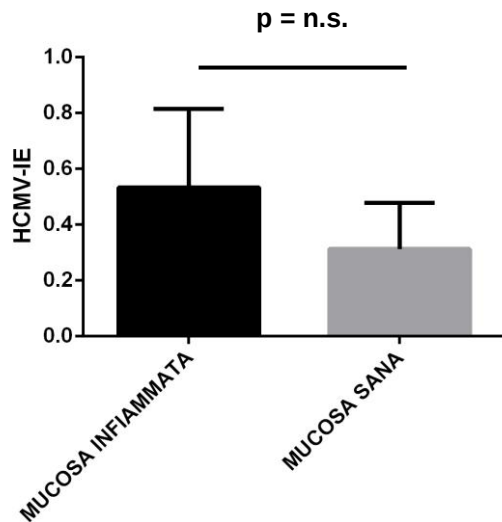


Figura 15: Livelli di espressione di HCMV-IE DNA in relazione alla presenza di infiammazione intestinale (è rappresentata la media dei valori e l'errore standard della media).

Su 24 biopsie è stata eseguito uno studio di carattere esplorativo dell'espressione del miRNA specifico per HCMV UL112, riscontrandone la positività nel 100% dei campioni analizzati. Anche in questo caso i valori di espressione erano inferiori allo standard di riferimento (miRNA estratto da fibroblasti infettati con CMV in coltura) (Figura 16).

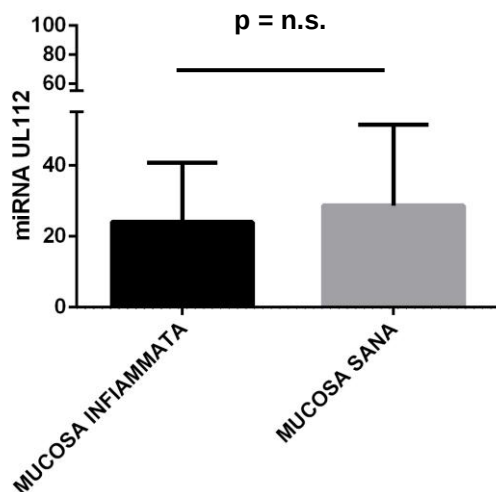


Figura 16: Livelli di espressione di HCMV miRNA UL112 in relazione alla presenza di infiammazione intestinale (è rappresentata la media dei valori e l'errore standard della media).

Nello studio prospettico volto a studiare l'immunità cellulare T HCMV-specifica nei pazienti affetti da MICI sono stati arruolati complessivamente 167 pazienti; di questi, 125 (75%) erano già stati esposti all'infezione da HCMV, manifestando una sierologia IgG positiva per il virus. Le caratteristiche della popolazione studiata sono riportate in Tabella 4.

Tabella 4: Caratteristiche della popolazione in studio

POPOLAZIONE ARRUOLATA	MICI	MC	CU
Totale pazienti	167	81 (48,5%)	86 (51,5%)
Maschi (n° pazienti e %)	97 (57%)	53 (55%)	44 (45%)
Femmine (n° pazienti e %)	70 (42%)	28 (40%)	42 (60%)
Età (mediana e range)	40 (18-82)	40 (19-82)	41 (18-74)
Caratteristiche MICI			
Durata di malattia in anni (mediana e range)	7 (1-31)		
Pregressa chirurgia (n° pazienti e %)	30 (18%)		
Manifestazioni extraintestinali (n° pazienti e %)	48 (28%)		
Localizzazione MC: ileale/ileo-colica/colica		16/45/20	
Localizzazione CU: proctite/sinistra/estesa			4/31/47
Portatori di J pouch			4

Ciascun paziente IgG positivo è stato sottoposto ad almeno una determinazione EliSpot (per un totale di 183 test) in diversi momenti a seconda dell'attività della malattia intestinale e a seconda di eventuali modifiche di terapia, con una media di 1.5 determinazioni/paziente (Tabella 5). Le caratteristiche dei pazienti all'arruolamento nello studio in relazione all'attività clinica di malattia (secondo gli score MTWSI e HBI) e al trattamento in corso sono riassunte in Tabella 6.

Quattordici pazienti sieronegativi alla prima determinazione sono stati rivalutati successivamente ripetendo la sierologia per HCMV in un secondo (11 pazienti) e terzo (3 pazienti) campione ematico per escludere una eventuale sieroconversione in corso

di trattamento con farmaci anti-TNF- α : in nessuno di questi pazienti si è osservata una positivizzazione delle IgG specifiche per HCMV.

Tabella 5: Distribuzione delle determinazioni EliSpot

Sierologia HCMV	MICI	MC	CU
IgG positivi	125 (75%)	59 (46%)	66 (52%)
IgG negativi	42 (25%)	22 (52%)	20 (48%)
Determinazioni EliSpot nei soggetti IgG positivi			
Complessive	183	97	86
N° pazienti con 1 EliSpot	76	29	47
N° pazienti con 2 EliSpot	41	24	17
N° pazienti con 3 EliSpot	7	5	2
N° pazienti con 4 EliSpot	1	1	0

Tabella 6: Caratteristiche cliniche dei pazienti al test di baseline.

Caratteristiche cliniche dei pazienti al momento del primo test EliSpot	N° pazienti
Remissione	66
Attività	59
Lieve	20
Moderata	29
Severa	8
Pouchite	2
Terapia Non Immunosoppressiva	47
Terapia Immunosoppressiva	78
Steroidi	15
Tiopurine	26
Anti-TNF	41
Altro	5

Il 13% dei pazienti ha dimostrato una bassa risposta immunitaria T-mediata nei confronti di HCMV (Tabella 7), con una mediana di 6 SFC/200000 PBMCs (range 0-19). Dodici di questi 17 pazienti stavano assumendo terapia immunosoppressiva (in particolare 1 paziente era in terapia con prednisone orale ad un dosaggio di 40 mg/die, 4 pazienti erano in terapia di mantenimento con azatioprina e 6 con biologici, 1 paziente era in doppia terapia immunosoppressiva con azatioprina e biologico). In 10 pazienti la malattia infiammatoria intestinale era almeno lievemente attiva secondo il corrispondente score clinico. Sei su 17 pazienti sono stati successivamente ritestati mediante IFN- γ EliSpot, riscontrando il ripristino di una normale risposta immunitaria HCMV-specifica in 5 casi. Il 29% dei pazienti aveva una risposta HCMV-specifica intermedia, con una mediana di 60.5 SFC/200000 PBMCs (range 24-99), mentre la maggioranza aveva una risposta elevata, con una mediana di 199.5 SFC/200000 PBMCs (range 100-1000).

Tabella 7: Risposta immune CMV specifica all'ingresso

Livelli di immunità HCMV specifica	MICI	MC	CU
Bassa (< 20 SFC/200000 PBMCs)	17 (13%)	8	9
Media (20-99 SFC/200000 PBMCs)	36 (29%)	22	14
Alta (>100 SFC/200000 PBMCs)	72 (58%)	29	43

Non sono stati osservati differenti livelli di immunità HCMV-specifica nella MC e nella CU, indipendentemente dallo stato di attività di malattia ($p = n.s.$) (Figure 17 e 18).

La terapia medica in corso per la MICI non influenza in maniera statisticamente significativa i livelli di immunità HCMV-specifica, sia nella MC che nella CU; il tipo di immunosoppressore (steroidi sistemici, tiopurine, biologici) o il numero di immunosoppressori associati non modifica in modo significativo il numero di SFCs al test EliSpot (figure 19 e 20).

In particolare, 19 pazienti indirizzati alla terapia biologica anti-TNF α che sono stati valutati con IFN- γ EliSpot immediatamente prima della prima somministrazione di farmaco (baseline) e con un prelievo nel corso del mantenimento, non hanno subito una significativa modificazione dei valori di immunità HCMV-specifica (Figura 21).

In totale 19 pazienti sono stati valutati durante una fase di riaccensione moderata-severa dei sintomi che aveva richiesto il ricovero ospedaliero. Tutti questi pazienti sono stati studiati anche mediante la ricerca di HCMV-DNA su siero e mediante la ricerca del genoma virale nelle biopsie prelevate nel corso dell'esame endoscopico di controllo. In 5 casi (26%) è stata riscontrata la presenza del virus replicante nel circolo sistemico e in 4 casi tale riscontro è stato confermato anche a livello delle biopsie coliche. In tutti i casi si trattava di pazienti con CU estesa. Quattro pazienti sono stati trattati con ganciclovir per via endovenosa con successiva negativizzazione della viremia sistemica. I valori dell'immunità HCMV-specifica al momento della riattivazione virale erano elevati (mediana 196 SFCs/200000PBMCs, range 12-929). Solo due di questi pazienti hanno acconsentito a ripetere il prelievo per un nuovo EliSpot dopo la risoluzione della riacutizzazione sia della malattia intestinale che dell'infezione sistemica e in entrambi i casi i livelli non si discostavano significativamente dal valore di baseline (665 e 757; 128 e 145, rispettivamente). Due pazienti su 5 avevano risposto al trattamento steroideo impostato durante il ricovero e non avevano richiesto successive modifiche della terapia; 2 pazienti avevano invece richiesto il passaggio a farmaci biologici per precoce riaccensione clinica della malattia e per un paziente era stato necessario ricorrere all'intervento di colectomia totale per mancata risposta sia alla ciclosporina che ad infliximab.

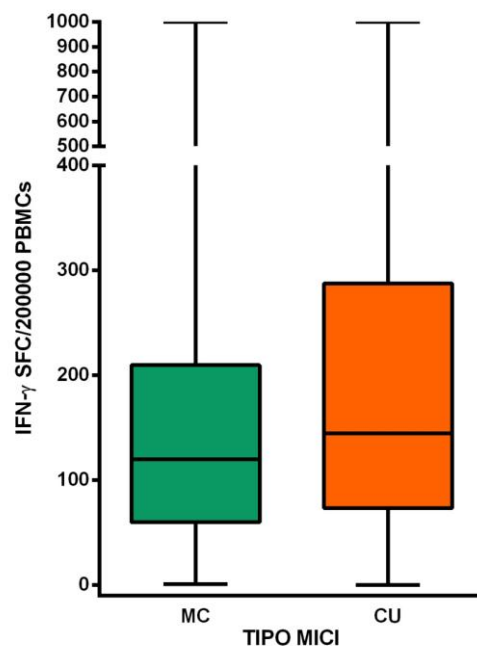


Figura 17: Immunità HCMV-specifica e tipo di MICI

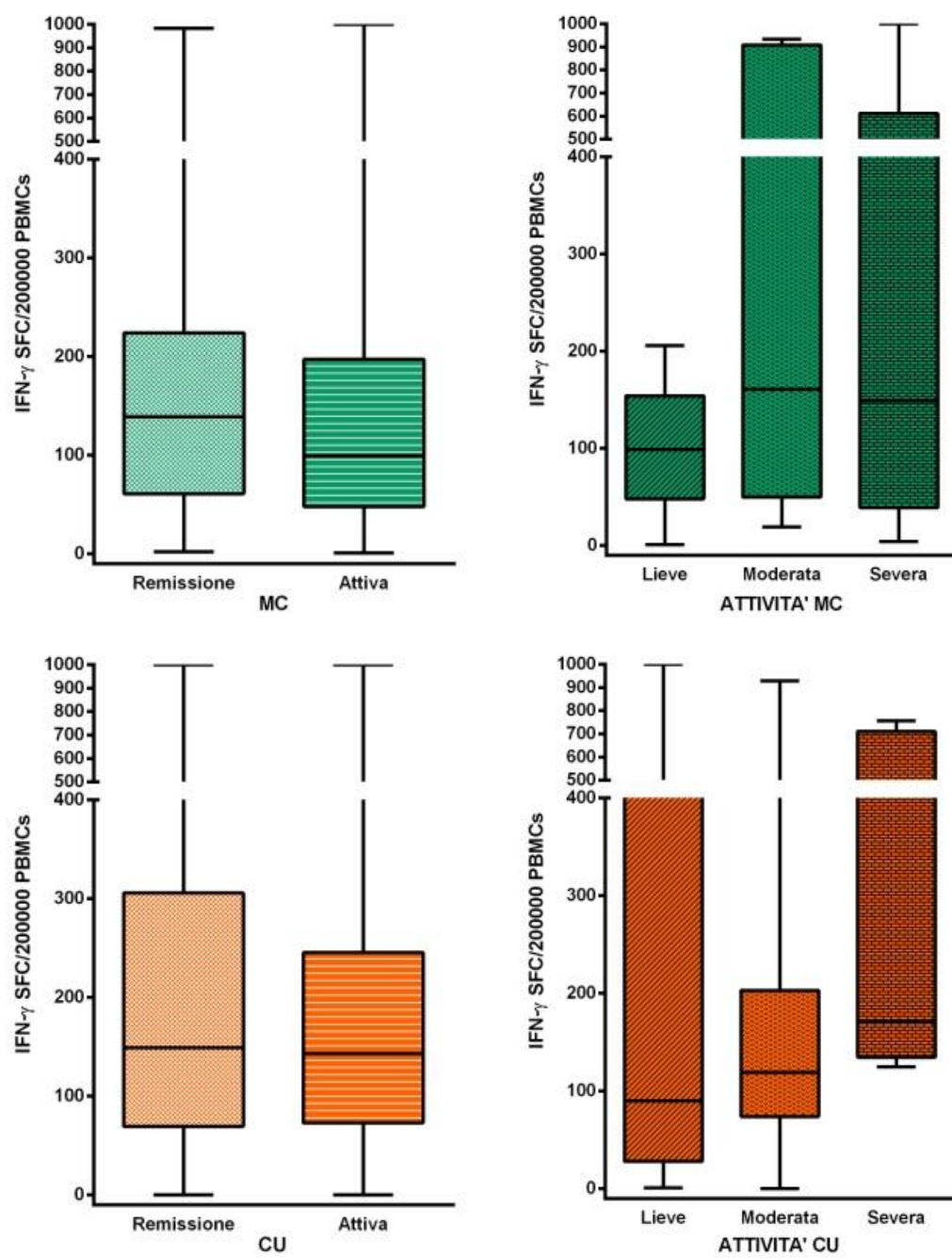


Figura 18: Immunità HCMV-specifica e attività clinica della MICI

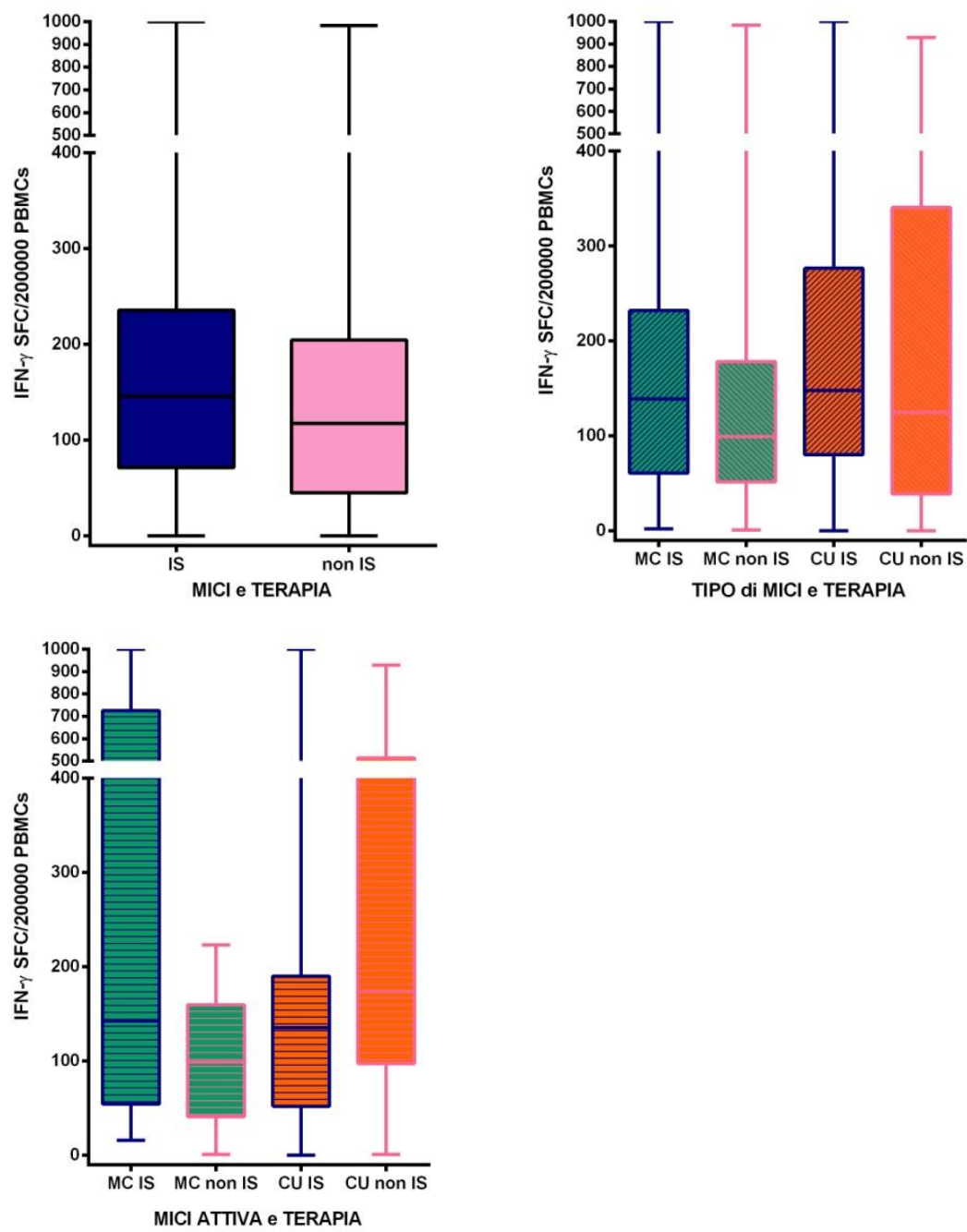


Figura 19: Immunità HCMV-specifica e terapia medica

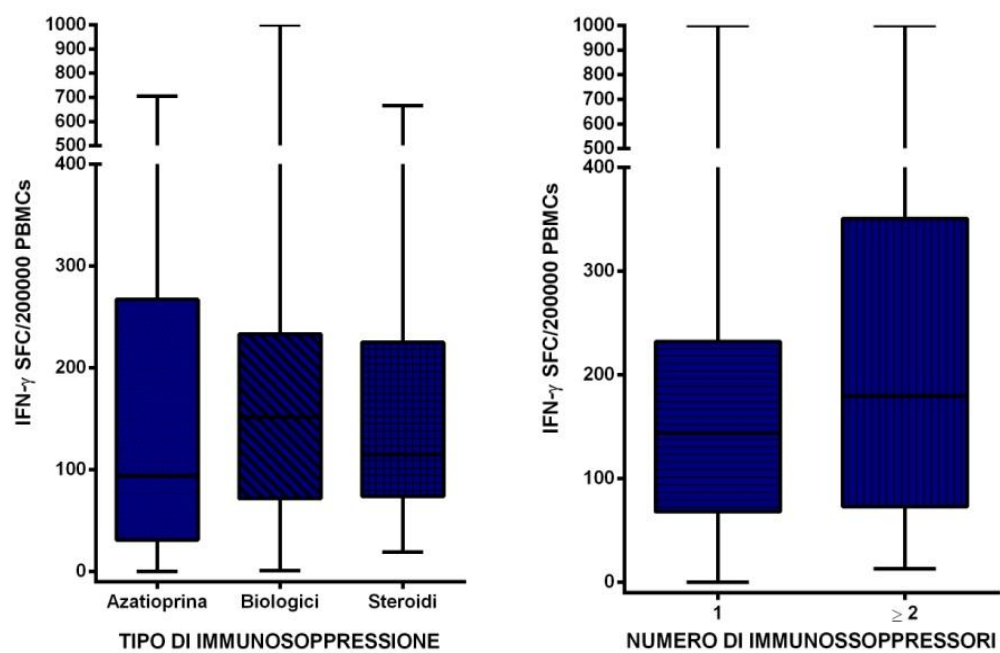


Figura 20: Immunità HCMV-specifica e immunosoppressione

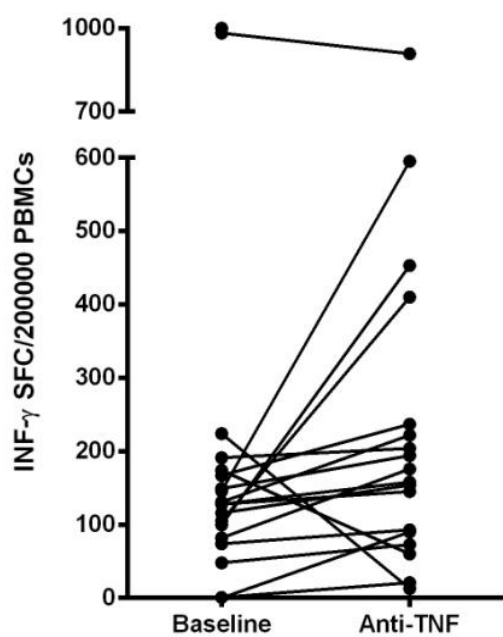


Figura 21: Andamento dei livelli di immunità HCMV-specifica dopo inizio della terapia con anti-TNF

6. DISCUSSIONE

Data l'ampia diffusione dell'infezione da HCMV nella popolazione generale non sorprende del tutto che il virus venga riscontrato di frequente anche nelle MICI. La natura patogena di HCMV, che è stata ampiamente dimostrata nei pazienti affetti da AIDS o sottoposti a trapianto, è tuttavia dubbia nell'ambito di queste patologie infiammatorie croniche.^{1,2}

I presupposti che fanno ipotizzare una relazione tra HCMV e MICI sono molteplici. Da un lato, il particolare tropismo del virus per i siti di infiammazione rende le MICI un contesto particolarmente favorevole; dall'altro, i meccanismi immuno-mediati, che costituiscono uno dei tasselli fondamentali nella patogenesi delle MICI, sembrano essere elemento imprescindibile alla riattivazione di HCMV.

Nel presente studio è stata in primo luogo valutata la prevalenza dell'infezione da HCMV nell'intestino dei pazienti affetti da MICI. Sono state utilizzate tecniche di IHC ad alta sensibilità allo scopo di individuare la presenza di un'eventuale microinfezione, ovvero di un'infezione attiva ma di basso grado, che si pensa potrebbe fungere da trigger per lo sviluppo e/o il mantenimento di fenomeni infiammatori e/o autoimmunitari.^{3,73} Tali metodiche non sono di impiego routinario, pertanto i risultati del presente studio non sono direttamente comparabili con la maggior parte dei dati pubblicati in letteratura. Nella popolazione in esame è emerso che nel 40% delle biopsie intestinali prelevate da pazienti con MC e nel 55% di quelle da pazienti con CU erano espressi antigeni IE di HCMV; percentuali simili sono state riscontrate anche per la positività all'antigene pp65 (37.5% nella MC e 58% nella CU). Come atteso, la presenza della positività antigenica per HCMV-IE è risultata connessa alla presenza di infiammazione intestinale, dato che nessuna delle biopsie provenienti dai soggetti di controllo e prelevate su mucosa sana di pazienti con MC e CU aveva evidenza di infezione. Solo in una minoranza di casi si è evidenziata una debole positività per pp65 in biopsie non infiammate provenienti da pazienti con MC (2 casi su 7) e CU (1 caso su 11) e da soggetti di controllo (1 su 14 biopsie). Non è emersa alcuna differenza significativa nella positività antigenica all'IHC tra pazienti in trattamento immunosoppressivo rispetto a quelli in terapia con aminosalicilati o senza terapia al momento della colonscopia. Sembra pertanto che il fattore determinante la riattivazione virale sia la flogosi intestinale e che il trattamento con immunosoppressori, siano essi biologici, tiopurine o steroidi sistemici, non conferisca a questa popolazione un rischio aumentato di riattivazione di HCMV. L'osservazione che soggetti affetti da MICI senza alcun trattamento immunosoppressivo esprimano con maggior frequenza gli antigeni di

HCMV rispetto ai soggetti di controllo fa pensare che sia la MICI sottostante a conferire il rischio, piuttosto che i trattamenti medici in corso. L'espressione di proteine virali non ristrette alle fasi precoci dell'infezione (a tal proposito nel presente studio è stato ricercato l'antigene di fase tardiva pp65) documenta che si tratta di un'infezione attiva e produttiva e che quindi il virus non sta albergando in forma latente nella mucosa intestinale di questi pazienti, coerentemente con la precedente esperienza del gruppo svedese.⁷⁵ Pur trattandosi di un'infezione attiva, la numerosità delle cellule infette nella maggior parte dei casi era piuttosto modesta, coerentemente con il fatto che si tratta perlopiù di microinfezioni, in cui la carica virale è bassa. Questo è confermato anche dalle poche copie di gene IE amplificate mediante RT-PCR. Nonostante il protocollo di IHC fosse ad alta sensibilità, la ricerca del genoma virale mediante PCR ha tuttavia documentato la presenza del virus in ulteriori 4 casi che erano risultati negativi allo studio IHC (2 biopsie dai soggetti di controllo, 1 biopsia da mucosa infiammata di un paziente con CU e 1 biopsia da mucosa sana di un paziente con CU). D'altro canto in 5 biopsie che erano risultate positive per almeno uno dei due antigeni di HCMV la ricerca del genoma aveva dato esito negativo. Non è possibile escludere che tale evenienza sia ascrivibile a problematiche di natura tecnica, data la qualità sub-ottimale del materiale biotico su cui è stata eseguita l'estrazione del DNA (biopsie intestinali di piccole dimensioni, fissate in formalina e incluse in paraffina).

Il ricorso sempre più frequente a trattamenti immunosoppressori, anche in associazione tra loro, per meglio controllare l'andamento delle MICI a fenotipo più aggressivo, ha fatto emergere la preoccupazione che anche questa categoria di pazienti potrebbe andare incontro a complicanze infettive di natura opportunistica, come accade di frequente per i soggetti affetti da AIDS e trapiantati. In questi pazienti è oramai ben noto che la riattivazione di HCMV produce un decorso clinico sfavorevole in termini di morbidità e di mortalità. Ciò che rende questi pazienti ad alto rischio sembra essere in particolare la disfunzione del compartimento T dell'immunità cellulare.^{41,43} In quest'ottica negli ultimi anni è stato proposto il monitoraggio della risposta immunitaria HCMV-specifica come ausilio nell'identificazione dei pazienti a maggior rischio di riattivazione virale dopo trapianto.^{44,45} Nell'ambito delle MICI è ancora dibattuto quali siano le categorie di pazienti a rischio; i dati della letteratura sono infatti controversi e tuttora non è chiaro se la steroide-dipendenza/refrattarietà rappresenti un fattore predisponente la riattivazione di HCMV o piuttosto ne sia una conseguenza. Inoltre non sono disponibili dati in merito alla capacità delle terapie immunosoppressive convenzionalmente utilizzate nelle MICI (in particolare tiopurine e

biologici anti-TNF) di rendere inefficace la risposta T-mediata HCMV-specifica; non è chiaro inoltre se sia invece l'attività clinica di malattia ad essere il fattore di predisposizione principale alla riattivazione virale. Nel presente studio prospettico è stata studiata la risposta immune HCMV specifica mediante IFN- γ EliSpot in 167 pazienti affetti da MICI. È emerso che indipendentemente dal tipo di diagnosi (MC vs CU), questi pazienti conservano un'efficace risposta immunitaria virus-specifica, come documentato dal numero medio-alto di SFCs/200000 PBMCs nell'87% dei casi. Anche l'attività clinica di malattia, classificata secondo i validati score HBI e MTWSI in lieve-moderata-severa, non sembra capace di indurre un calo della risposta HCMV-specifica che possa predisporre alla riattivazione del virus. Il sempre più frequente riscontro in letteratura di casi di riattivazione di HCMV o sovrainfezione da HCMV in soggetti immunocompetenti affetti da CU, non in trattamento con steroidi sistemici o con immunosoppressori, ha fatto emergere nel corso degli anni l'ipotesi che potesse essere l'esacerbazione stessa della malattia intestinale ad indurre la riattivazione virale.⁸⁵⁻⁸⁸ Tuttavia il riscontro di normali livelli di immunità HCMV-specifica, indipendentemente dallo stato di attività della malattia intestinale, sembra in controtendenza con quanto riportato in letteratura: l'esigua numerosità dei soggetti in fase di riaccensione severa di MICI rappresenta un limite del presente studio e tale riscontro andrà pertanto confermato su un campione più ampio di pazienti con queste caratteristiche. Anche il riscontro di una maggiore attivazione linfocitaria HCMV-specifica proprio nei soggetti con CU severa (seppur non significativamente superiore a quella riscontrata nella CU lieve e moderata) appare in controtendenza con quanto atteso. Tuttavia non è possibile escludere che questo possa essere secondario a riattivazioni virali transienti e subcliniche che potrebbero avere determinato un impulso nella risposta immunitaria facendo crescere temporaneamente il pool di cellule T attivate nei confronti di HCMV.

Nell'ambito dei trattamenti immunomodulanti utilizzati nelle MICI negli ultimi anni particolare attenzione è stata dedicata alla sicurezza dei farmaci biologici anti-TNF, sempre più spesso utilizzati nelle forme di MICI più aggressive, anche in fase precoce. Da studi in vitro è emerso che il TNF- α appare giocare un ruolo determinante nella riattivazione di HCMV sia nei monociti che nelle cellule dendritiche; a loro volta i monociti infettati dal virus acquisiscono un fenotipo M1 che induce l'espressione di citochine pro-infiammatorie IL-6, TNF- α e IL-1 β a supporto di un ambiente favorevole alla replicazione virale.^{89,90} Sembra pertanto ragionevole pensare che sia sicuro somministrare un trattamento anti-TNF- α in pazienti con concomitante infezione da HCMV e che potrebbe essere addirittura efficace per il controllo dell'infezione stessa.

Questo è supportato da alcune, per il momento poche, esperienze provenienti dalla pratica clinica, dalle quali sembra emergere che somministrare farmaci biologici non sia rischioso nei pazienti con CU steroido-refrattaria e infezione da HCMV e che nel corso del trattamento con biologici non esista una maggior predisposizione alla riattivazione del virus.^{82,83,91} Esistono tuttavia anche evidenze del contrario: nell'esperienza di Helbling et al. il trattamento con anti-TNF- α aveva indotto la disseminazione del virus.⁹² L'esperienza su 19 casi la cui immunità specifica nei confronti di HCMV è stata monitorata nel corso del trattamento con biologici anti-TNF- α con almeno 2 determinazioni suggerisce che tali trattamenti non siano in grado di indurre una maggiore suscettibilità alla riattivazione del virus e pertanto siano da considerare sicuri. Infatti il numero di SFCs rimaneva pressoché inalterato nel corso del follow-up.

Le modalità di evasione del sistema immunitario dell'organismo ospite messe in atto da HCMV sono molteplici; negli ultimi anni particolare attenzione è stata rivolta ai micro RNA (miRNA), piccole molecole di RNA lunghe circa 20-24 basi che svolgono principalmente una funzione regolatoria, influenzando l'espressione genica. Questo avviene mediante il legame a sequenze target di specifici trascritti, inducendone il clivaggio o la mancata traduzione. I miRNA sono ubiquitari negli organismi eucarioti multicellulari, ma anche i virus a DNA sono capaci di produrli, e la famiglia degli Herpesvirus ne è un esempio.⁹³⁻⁹⁶ A differenza degli altri membri della famiglia Herpes, HCMV esprime i suoi miRNA sin dalle fasi precoci dell'infezione litica produttiva, accumulandosi nel tempo e non è noto se continuino ad essere prodotti anche nel corso della fase di latenza. Si ritiene che i miRNA virali agiscano da un lato interagendo con sequenze cellulari, allo scopo di manipolare l'espressione genica della cellula ospite per creare un ambiente favorevole al virus, dall'altro modulando l'espressione genica del virus stesso, per garantire una precisa sequenza temporale o addirittura tessuto-specifica nelle varie fasi dell'infezione. Degli 11 miRNA di HCMV finora identificati UL112 è quello per il quale sono state identificate e confermate sperimentalmente delle funzioni precise. miRNA UL112 è capace di sopprimere l'espressione di un gene cellulare MICB come strategia di immuno-evasione.⁹⁷ In aggiunta, sarebbe capace di sopprimere l'espressione virale di antigeni IE e di indurre una significativa riduzione dei livelli di DNA virale, favorendo la progressione verso la fase di latenza.^{98,99} L'espressione di miRNA UL112 riscontrata in tutte le biopsie intestinali dei pazienti con MICI valutati nel presente studio è coerente con quanto riportato in letteratura e farebbe pensare che il riscontro alla PCR di poche copie di

genoma virale in questi soggetti sia conseguenza degli stessi meccanismi di immuno-evasione messi in atto dal virus per garantire la sua persistenza nell'organismo ospite.

7. CONCLUSIONI

Sembra plausibile pensare che il virus che alberga in forma latente nell'organismo ospite risenta favorevolmente dell'ambiente infiammatorio tipico delle MICI in fase attiva e che sia questo a determinarne la riattivazione, indipendentemente dal trattamento medico in corso per la malattia di base. Il virus metterebbe subito in atto meccanismi volti a ripristinare la fase di latenza per evitare che il sistema immune dell'ospite, riattivando ed espandendo il compartimento cellulare T HCMV-specifico, riesca a eliminare, almeno in parte, l'infezione. Alla luce di queste considerazioni, potrebbe essere dunque più ragionevole instaurare la terapia medica più efficace nel controllare l'infiammazione intestinale (senza aver timore nell'usare gli immunosoppressori) piuttosto che puntare solo sulla terapia antivirale per risolvere l'infezione attiva. Tenuto conto della capacità di HCMV di indurre a sua volta un ambiente pro-infiammatorio, forse la combinazione tra up-grade della terapia per la MICI e terapia antivirale potrebbe essere l'approccio più indicato.

Rimangono tuttavia ancora molti dubbi circa il ruolo che HCMV esercita sul decorso delle MICI, pertanto saranno necessari ulteriori studi su più ampie casistiche prospettiche per fare luce su questi aspetti.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis* 2004;4(12):725-738.
2. Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, et al. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther* 2003;98(3):269-297.
3. Söderberg-Nauclér C. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *J Intern Med* 2006;259(3):219-246.
4. Mocarski, E. S. & Tan Courcelle, C. (2001). Cytomegaloviruses and their replication. In *Fields Virology*, 4th edn, vol. 2, pp. 2629–2673. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
5. Söderberg-Nauclér C, Fish K, Nelson JA. Cytomegalovirus. In *Persistent Viral Infections*. 1999, p.209-242: Ahmed R, Chen ISY (ed.), John Wiley & Sons.
6. Compton T, Nowlin DM, Cooper NR. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 1993;193(2):834-841.
7. Compton T, Nepomuceno RR, Nowlin DM. Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology* 1992;191(1):387-395.
8. Jarvis MA, Nelson JA. Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. *Curr Opin Microbiol* 2002;5(4):403-407.
9. Einhorn L, Ost A. Cytomegalovirus infection of human blood cells. *J Infect Dis* 1984;149(2):207-214.
10. Waldman WJ, Knight DA, Huang EH, et al. Bidirectional transmission of infectious cytomegalovirus between monocytes and vascular endothelial cells: an in vitro model. *J Infect Dis* 1995;171(2):263-272.
11. Slobedman B, Mocarski ES. Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J Virol*. 1999 Jun;73(6):4806-4812.
12. Söderberg-Nauclér C, Streblow DN, Fish KN, et al. Reactivation of latent human cytomegalovirus in CD14(+) monocytes is differentiation dependent. *J Virol* 2001;75(16):7543-7554.
13. Taylor-Wiedeman J, Sissons P, Sinclair J. Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers. *J Virol* 1994;68(3):1597-1604.

14. Söderberg-Nauclér C, Fish KN, Nelson JA. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha specifically induce formation of cytomegalovirus-permissive monocyte-derived macrophages that are refractory to the antiviral activity of these cytokines. *J Clin Invest* 1997;100(12):3154-3163.
15. Stein J, Volk HD, Liebenthal C, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates the activity of the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter in immature monocytic cells. *J Gen Virol* 1993;74:2333-2338.
16. Ritter T, Brandt C, Prösch S, et al. Stimulatory and inhibitory action of cytokines on the regulation of hCMV-IE promoter activity in human endothelial cells. *Cytokine* 2000;12(8):1163-1170.
17. Zanghellini F, Boppana SB, Emery VC, et al. Asymptomatic primary cytomegalovirus infection: virologic and immunologic features. *J Infect Dis* 1999;180(3):702-707.
18. Pass RF. Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. *J Infect Dis* 1985;152(2):243-248.
19. Grigoleit U, Riegler S, Einsele H, et al. Human cytomegalovirus induces a direct inhibitory effect on antigen presentation by monocyte-derived immature dendritic cells. *Br J Haematol* 2002;119(1):189-198.
20. Moutaftsi M, Mehl AM, Borysiewicz LK, et al. Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2002;99(8):2913-2921.
21. Varani S, Frascaroli G, Homman-Loudiyi M, et al. Human cytomegalovirus inhibits the migration of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR1 and CCR5. *J Leukoc Biol* 2005;77(2):219-228.
22. MacCormac LP, Grundy JE. Human cytomegalovirus induces an Fc gamma receptor (Fc gamma R) in endothelial cells and fibroblasts that is distinct from the human cellular Fc gamma Rs. *J Infect Dis* 1996;174:1151–1161.
23. Xu B, Murayama T, Ishida K, et al. Characterization of IgG Fc receptors induced by human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 1989;70:893–900.
24. Lilley BN, Ploegh HL, Tirabassi RS. Human citomegalovirus open reading frame TRL11/IRL11 encodes an immunoglobulin G Fc-binding protein. *J Virol* 2001;75:11218–1121.

25. Spiller OB, Morgan BP, Tufaro F, et al. Altered expression of host encoded complement regulators on human cytomegalovirus infected cells. *Eur J Immunol* 1996;26:1532–1538.
26. Spear GT, Lurain NS, Parker CJ, et al. Host cell-derived complement control proteins CD55 and CD59 are incorporated into the virions of two unrelated enveloped viruses. Human T cell leukemia/lymphoma virus type I (HTLV-I) and human cytomegalovirus (HCMV). *J Immunol* 1995;155:4376–4381.
27. Rowshani AT, Bemelman FJ, van Leeuwen EM, et al. Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2005;79(4):381-386.
28. Ljungnan P, et al. Definitions of CMV infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002;34:1094-1097.
29. Revello MG, Zavattoni M, Sarasini A, et al. Human cytomegalovirus in blood of immunocompetent persons during primary infection: prognostic implications for pregnancy. *J Infect Dis* 1998;177(5):1170-1175.
30. Stagno S, Pass RF, Cloud G, et al. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA* 1986;256(14):1904-1908.
31. Detels R, Tarwater P, Phair JP, et al; Multicenter AIDS Cohort Study. Effectiveness of potent antiretroviral therapies on the incidence of opportunistic infections before and after AIDS diagnosis. *AIDS* 2001;15(3):347-355.
32. Fishman JA, Emery V, Freeman R, et al. Cytomegalovirus in transplantation - challenging the status quo. *Clin Transplant* 2007;21(2):149-158.
33. Just-Nübling G, Korn S, Ludwig B, et al. Primary cytomegalovirus infection in an outpatient setting--laboratory markers and clinical aspects. *Infection* 2003;31(5):318-323.
34. Basson J, Tardy JC, Aymard M. Pattern of anti-cytomegalovirus IgM antibodies determined by immunoblotting. A study of kidney graft recipients developing a primary or recurrent CMV infection. *Arch Virol* 1989;108(3-4):259-270.
35. Nielsen SL, Sørensen I, Andersen HK. Kinetics of specific immunoglobulins M, E, A, and G in congenital, primary, and secondary cytomegalovirus infection studied by antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1988;26(4):654-661.
36. Lazzarotto T, Spezzacatena P, Varani S, et al. Anticytomegalovirus (anti-CMV) immunoglobulin G avidity in identification of pregnant women at risk of

- transmitting congenital CMV infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6(1):127-129.
37. Lazzarotto T, Spezzacatena P, Pradelli P, et al. Avidity of immunoglobulin G directed against human cytomegalovirus during primary and secondary infections in immunocompetent and immunocompromised subjects. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4(4):469-473.
 38. Rimsza LM, Vela EE, Frutiger YM, et al. Rapid automated combined in situ hybridization and immunohistochemistry for sensitive detection of cytomegalovirus in paraffin-embedded tissue biopsies. *Am J Clin Pathol* 1996;106:544–548.
 39. de Castro ML, Tardío A, del Campo V, et al. A comparative study of two histological techniques for the identification of cytomegalovirus infection in colorectal biopsies from patients with chronic inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2009;101:697–705.
 40. Herfarth HH, Long MD, Rubinas TC, et al. Evaluation of a non-invasive method to detect cytomegalovirus (CMV)-DNA in stool samples of patients with inflammatory bowel disease (IBD): a pilot study. *Dig Dis Sci* 2010;55:1053–1058.
 41. Baldanti F, Lilleri D, Gerna G. Monitoring human cytomegalovirus infection in transplant recipients. *J Clin Virol* 2008;41(3):237-241.
 42. Letsch A, Scheibenbogen C. Quantification and characterization of specific T-cells by antigen-specific cytokine production using ELISPOT assay or intracellular cytokine staining. *Methods* 2003;31(2):143-149.
 43. Costa C, Saldan A, Sinesi F, et al. The lack of cytomegalovirus-specific cellular immune response may contribute to the onset of organ infection and disease in lung transplant recipients. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2012;25(4):1003-1009.
 44. Abate D, Cesaro S, Cofano S, et al. Diagnostic utility of human cytomegalovirus-specific T-cell response monitoring in predicting viremia in pediatric allogeneic stem-cell transplant patients. *Transplantation* 2012;93(5):536-542.
 45. Abate D, Fiscon M, Saldan A, et al. Human cytomegalovirus-specific T-cell immune reconstitution in preemptively treated heart transplant recipients identifies subjects at critical risk for infection. *J Clin Microbiol* 2012;50(6):1974-1980.

46. Mercorelli B, Lembo D, Palù G, Loregian A. Early inhibitors of human cytomegalovirus: state-of-art and therapeutic perspectives. *Pharmacol Ther.* 2011;131(3):309-29.
47. Schirbel A, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: Established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy. *J Dig Dis* 2010;11(5):266-276.
48. Dalziel TK. Chronic interstitial enteritis. *BMJ* 1913;2:1068–1070.
49. Crohn BB, Ginsberg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: a clinical and pathological entity. *JAMA* 1932;99:1323–1329.
50. Pierce ES. Where are all the *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in patients with Crohn's disease? *PLoS Pathog* 2009;5(3):e1000234.
51. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012;142(1):46-54.
52. Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126(6):1504–1517.
53. Hansen R, Thomson JM, El-Omar EM, et al. The role of infection in the aetiology of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2010;45(3):266-276.
54. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2008;134(2):577-594.
55. Neurath MF, Finotto S. Translating inflammatory bowel disease research into clinical medicine. *Immunity* 2009;31(3):357-361.
56. Monteleone G, Caprioli F. T-cell-directed therapies in inflammatory bowel diseases. *Clin Sci (Lond)* 2010;118(12):707-715.
57. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, et al; European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *J Crohns Colitis* 2010;4(1):28-62.
58. Dignass A, Lindsay JO, Sturm A, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 2: current management. *J Crohns Colitis* 2012;6(10):991-1030.
59. Orlando A, Armuzzi A, Papi C, et al; Italian Society of Gastroenterology; Italian Group for the study of Inflammatory Bowel Disease. The Italian Society of

- Gastroenterology (SIGE) and the Italian Group for the study of Inflammatory Bowel Disease (IG-IBD) Clinical Practice Guidelines: The use of tumor necrosis factor-alpha antagonist therapy in inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 2011;43(1):1-20.
60. Rahier JF, Ben-Horin S, Chowers Y, et al; European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). European evidence-based Consensus on the prevention, diagnosis and management of opportunistic infections in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2009;3(2):47-91.
 61. Mehraein Y, Lennerz C, Ehlhardt S, et al. Latent Epstein-Barr virus (EBV) infection and cytomegalovirus (CMV) infection in synovial tissue of autoimmune chronic arthritis determined by RNA- and DNA-in situ hybridization. *Mod Pathol* 2004;17(7):781-789.
 62. Newkirk MM, Watanabe Duffy KN, Leclerc J, et al. Detection of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and herpes virus-6 in patients with rheumatoid arthritis with or without Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol* 1994;33(4):317-322.
 63. Sekigawa I, Nawata M, Seta N, et al. Cytomegalovirus infection in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20(4):559-564.
 64. Hommes DW, Sterringa G, van Deventer SJ, et al. The pathogenicity of cytomegalovirus in inflammatory bowel disease: a systematic review and evidence-based recommendations for future research. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10(3):245-250.
 65. Varani S, Landini MP. Cytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences. *Herpesviridae* 2011;2(1):6.
 66. Fujinami RS, Oldstone MB. Molecular mimicry as a mechanism for virus-induced autoimmunity. *Immunol Res* 1989;8:3–15.
 67. Söderberg C, Larsson S, Rozell BL, et al. Cytomegalovirus induced CD13 specific autoimmunity – a possible cause of chronic graft versus- host disease. *Transplantation* 1996;61:600–609.
 68. Söderberg-Nauclér C, Sumitran-Karuppan S, Ljungman P, et al. CD13-specific autoimmunity in cytomegalovirus-infected immunocompromised patients. *Transplantation* 1996;61:594-600.
 69. Rahbar A, Boström L, Söderberg-Naucler C. Detection of cytotoxic CD13-specific autoantibodies in sera from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Autoimmun* 2006;26(3):155-164.

70. Verdonk RC, Haagsma EB, Van Den Berg AP, et al. Inflammatory bowel disease after liver transplantation: a role for cytomegalovirus infection. *Scand J Gastroenterol* 2006;41(2):205-211.
71. Criscuoli V, Casà A, Orlando A, et al. Severe acute colitis associated with CMV: a prevalence study. *Dig Liver Dis* 2004;36(12):818-820.
72. Yoshino T, Nakase H, Ueno S, et al. Usefulness of quantitative real-time PCR assay for early detection of cytomegalovirus infection in patients with ulcerative colitis refractory to immunosuppressive therapies. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13(12):1516-1521.
73. Söderberg-Nauclér C. HCMV microinfections in inflammatory diseases and cancer. *J Clin Viro.* 2008;41(3):218-223.
74. Cobbs CS, Harkins L, Samanta M, et al. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res* 2002;62:3347–3350.
75. Rahbar A, Bostrom L, Lagerstedt U, et al. Evidence of active cytomegalovirus infection and increased production of IL-6 in tissue specimens obtained from patients with inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2003;9:154–161.
76. Matsuoka K, Iwao Y, Mori T, et al. Cytomegalovirus is frequently reactivated and disappears without antiviral agents in ulcerative colitis patients. *Am J Gastroenterol* 2007;102(2):331-337.
77. Papadakis KA, Tung JK, Binder SW, et al. Outcome of cytomegalovirus infections in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96(7):2137-2142.
78. Maconi G, Colombo E, Zerbi P, et al. Prevalence, detection rate and outcome of cytomegalovirus infection in ulcerative colitis patients requiring colonic resection. *Dig Liver Dis* 2005;37(6):418-423.
79. Roblin X, Pillet S, Oussalah A, et al. Cytomegalovirus load in inflamed intestinal tissue is predictive of resistance to immunosuppressive therapy in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2011;106(11):2001-2008.
80. Kim YS, Kim YH, Kim JS, et al; IBD Study Group of the Korean Association for the Study of Intestinal Diseases. The prevalence and efficacy of ganciclovir on steroid-refractory ulcerative colitis with cytomegalovirus infection: a prospective multicenter study. *J Clin Gastroenterol* 2012;46(1):51-56.
81. Shale MJ, Seow CH, Coffin CS, et al. Review article: chronic viral infection in the anti-tumour necrosis factor therapy era in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;31(1):20-34.

82. Lavagna A, Bergallo M, Daperno M, et al. Infliximab and the risk of latent viruses reactivation in active Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:896–902.
83. D'Ovidio V, Vernia P, Gentile G, et al. Cytomegalovirus infection in inflammatory bowel disease patients undergoing anti-TNF alpha therapy. *J Clin Virol* 2008;43:180–183.
84. Pillet S, Pozzetto B, Jarlot C, et al. Management of cytomegalovirus infection in inflammatory bowel diseases. *Dig Liver Dis* 2012;44(7):541-548.
85. Rachima C, Maoz E, Apter S, et al. Cytomegalovirus infection associated with ulcerative colitis in immunocompetent individuals. *Postgrad Med J* 1998;74(874):486-489.
86. Pfau P, Kochman ML, Furth EE, et al. Cytomegalovirus colitis complicating ulcerative colitis in the steroid-naïve patient. *Am J Gastroenterol* 2001;96(3):895-899.
87. Streetz KL, Buhr T, Wedemeyer H, et al. Acute CMV-colitis in a patient with a history of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2003;38(1):119-122.
88. Osaki R, Andoh A, Tsujikawa T, et al. Acute cytomegalovirus infection superimposed on corticosteroid-naïve ulcerative colitis. *Intern Med* 2008;47(14):1341-1344.
89. Hahn G, Jores R, Mocarski ES. Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3937–3942.
90. Chan G, Bivins-Smith ER, Smith MS, et al. Transcriptome analysis reveals human cytomegalovirus reprograms monocyte differentiation toward an M1 macrophage. *J Immunol* 2008;181:698–711.
91. Criscuoli V, Mocciaro F, Orlando A, et al. Cytomegalovirus disappearance after treatment for refractory ulcerative colitis in 2 patients treated with infliximab and 1 patient with leukapheresis. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:810–811.
92. Helbling D, Breitbatch TH, Krause M. Disseminate cytomegalovirus infection in Crohn's disease following anti-tumor necrosis factor therapy. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2002;14:1393–1395.
93. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004;431:350–355.
94. Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* 2006;11:441–450.

95. Zhao Y, Srivastava D. A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci* 2007;32:189–197.
96. Lee Y, Jeon K, Lee JT, et al. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002;21:4663–4670.
97. Stern-Ginossar N, Elefant N, Zimmermann A, et al. Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science* 2007;317:376–381.
98. Murphy E, Vanicek J, Robins H, et al. Suppression of immediate-early viral gene expression by herpesvirus-coded microRNAs: implications for latency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:5453–5458.
99. Grey F, Meyers H, White EA, et al. A human cytomegalovirus-encoded microRNA regulates expression of multiple viral genes involved in replication. *PLoS Pathog* 2007;3(11):e163.

9. RINGRAZIAMENTI

Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Gastroenterologiche, Università di Padova

Renata D'Inca

Matteo Martinato

Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Padova

Davide Abate

Alda Saldan

Giorgio Palù

Department of Medicine, Karolinska Institute, Stockholm

Abdul Aleem Mohammad

Afsar Rahbar

Cecilia Söderberg-Nauclér

Chato Taher

Koon Chu Yaiw

Associazione Roberto Farini ONLUS e Fondazione Marina Minnaja ONLUS hanno finanziato la borsa di studio.