

**UNIVERSITÀ
DI PAVIA**

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia
Laboratorio di Microbiologia e Virologia

**Nuovi marcatori per la gestione dell’infezione da
citomegalovirus nel paziente trapiantato di cellule staminali
ematopoietiche**

Relatore:

Prof. Maria Rosalia Pasca

Correlatore:

Dott.ssa. Irene Cassaniti

Dott.ssa Dalila Mele

Tesi Sperimentale di
Marta Montanari

Anno Accademico 2025/2026

1	CITOMEGALOVIRUS UMANO	5
1.1	<i>Struttura e genoma del virus</i>	5
1.2	<i>Ciclo replicativo</i>	7
1.3	<i>Latenza del virus</i>	8
1.4	<i>Immunità e immunoevasione</i>	10
2	LA DIAGNOSI DELL'INFEZIONE DA HCMV E GLI ASPETTI CLINICI	18
2.1	<i>Diagnosi</i>	18
2.1.1	<i>Diagnosi sierologica</i>	18
2.1.2	<i>Diagnosi virologica diretta</i>	19
2.2	<i>Quadri clinici dell'infezione da HCMV</i>	20
2.2.1	<i>Infezione nei pazienti immunocompetenti</i>	20
2.2.2	<i>Infezione congenita</i>	20
2.2.3	<i>Infezione nei pazienti immunocompromessi</i>	23
3	TRAPIANTO CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE (HSCT).....	24
3.1	<i>Complicanze associate al trapianto</i>	27
3.2	<i>Infezioni post trapianto</i>	28
3.3	<i>Infezioni batteriche nel trapianto di cellule staminali ematopoietiche.....</i>	29
3.4	<i>Infezioni fungine post-trapianto di cellule staminali ematopoietiche.....</i>	30
3.5	<i>Infezioni virali post trapianto.....</i>	31
3.6	<i>HCMV nei pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche.....</i>	31
4	TERAPIE ANTI-HCMV: Farmaci antivirali utilizzati per la gestione dell'infezione da HCMV	32
4.1	<i>Trattamento dell'infezione</i>	32
4.2	<i>Ganciclovir e Valganciclovir</i>	33
4.3	<i>Foscarnet.....</i>	34
4.4	<i>Cidofovir.....</i>	35
4.5	<i>Letemovir</i>	36
5	SCOPO DEL LAVORO.....	37

6	MATERIALI E METODI	39
6.1	<i>Pazienti arruolati e follow-up</i>	39
6.2	<i>Isolamento cellule mononucleate da sangue periferico</i>	40
6.2.1	<i>Monitoraggio HCMV DNA su sangue intero.....</i>	41
6.2.2	<i>Isolamento e crioconservazione delle cellule mononucleate di sangue periferico.....</i>	42
6.3	<i>Determinazione della risposta immune nei confronti di HCMV.....</i>	42
6.4	<i>T.Spot.CMV</i>	43
6.5	<i>Valutazione della risposta T cellulare HCMV-specifica su sangue intero: QUANTIferon CMV e pp65-IGRA</i>	46
6.6	<i>Analisi statistica</i>	47
7	RISULTATI	48
7.1	<i>Caratteristiche della popolazione in studio</i>	48
7.2	<i>Evoluzione della risposta immunitaria T HCMV-specifica al giorno +100 e al giorno +180 post-trapianto</i>	51
7.3	<i>Confronto della risposta immunitaria cellulo-mediata CMV-specifica tra i gruppi CTR e N-CTR.....</i>	53
7.4	<i>Valutazione della performance diagnostica dei saggi immunologici</i>	55
8	DISCUSSIONE	58
9	BIBLIOGRAFIA	62

*Alla mia famiglia, per il sostegno, la pazienza e l'amore
con cui mi avete accompagnato in questo percorso.*

1 CITOMEGALOVIRUS UMANO

Il citomegalovirus umano (Human Cytomegalovirus, HCMV), conosciuto anche come Herpesvirus umano 5 (HHV-5), è un virus della famiglia Herpesviridae, appartenente alla sottofamiglia dei *Betaherpesvirinae*. Come tutti i virus della famiglia, è in grado di dare latenza e persistere dunque a vita nell'individuo infetto. Si tratta di un virus ubiquitario che deve il suo nome al tipico effetto citopatico che provoca sulle cellule infettate nelle quali causa un aumento di volume prima di provocarne la lisi cellulare. (Antonelli and Clementi, 2007). Il tipico effetto citopatico permette di riconoscere l'infezione virale nelle colture cellulari infette. Dal punto di vista istologico l'infezione è caratterizzata dalla presenza di tipiche inclusioni nucleari, definite "ad occhio di gufo" (owl's eye cells), inclusioni citoplasmatiche perinucleari e un ingrandimento della cellula (citomegalia). (Ryan, 2021)

HCMV è trasmesso tramite contatto ravvicinato e scambio di fluidi corporei. Il contagio avviene spesso in ambienti domestici o scolastici, specialmente attraverso il contatto con urine o saliva fra bambini, rapporti sessuali, o da madre a feto durante la gravidanza (Loscalzo et al., 2022). Il virus infetta le cellule epiteliali mucosali, cellule endoteliali vascolari, leucociti, monociti e cellule staminali pluripotenti CD34+, che possono differenziarsi in monociti e mantenere la latenza virale (Ryan, 2021).

Clinicamente l'infezione da HCMV può determinare un ampio spettro di manifestazioni da forme asintomatiche o simil-mononucleosiche nei soggetti immunocompetenti fino a gravi malattie disseminate nei pazienti immunocompromessi. Inoltre, rappresenta una delle principali cause di infezione congenita, potendo determinare gravi malformazioni neonatali. (Loscalzo et al., 2022).

L'infezione presenta una distribuzione mondiale. Nei paesi industrializzati la popolazione sieropositiva si aggira tra il 50% e il 75% mentre nei paesi in via di sviluppo supera il 90% probabilmente a causa delle condizioni igienico-sanitarie meno favorevoli (Ryan, 2021).

1.1 *Struttura e genoma del virus*

HCMV è un virus a DNA lineare a doppia elica (dsDNA), con un diametro compreso tra 200 e 300 nm, risultando il più grande tra gli herpesvirus umani. Il genoma misura circa 235–236 kbp, rappresentando uno dei genomi più estesi tra i virus umani (Grgic and Gorenec, 2024). Il genoma dell'HCMV è organizzato secondo una struttura di tipo E, costituita da due domini principali, Long (L) e Short (S). Ciascun dominio contiene una regione unica (UL e US) ed

è fiancheggiato da ripetizioni invertite terminali e interne (TRL, IRL, TRS, IRS), che consentono la formazione di isomeri genomici (Ye et al., 2020). Il genoma codifica oltre 170 open reading frames e circa 200 proteine (Grgic and Gorenc, 2024).

Come gli altri herpesvirus il virione presenta un capsidico icosaedrico di 162 capsomeri, un tegumento elettron-denso circondato da un involucro (envelope) di natura lipoproteica in cui sono localizzate le glicoproteine che fungono da recettori fondamentali per la penetrazione nella cellula (Figura 1) (Antonelli and Clementi, 2007).

Tra le proteine del tegumento, la fosfoproteina 65 (pp65) è la proteina più abbondante codificata dal gene UL83 e localizzata nella matrice inferiore, mentre il transattivatore del virione pp71 è proteina della matrice superiore prodotta dal gene UL82. Tra le altre proteine, la proteina pp150 prodotta dal gene UL32 si associa al capsidico del nucleo ed è essenziale per la maturazione e stabilizzazione del virione.

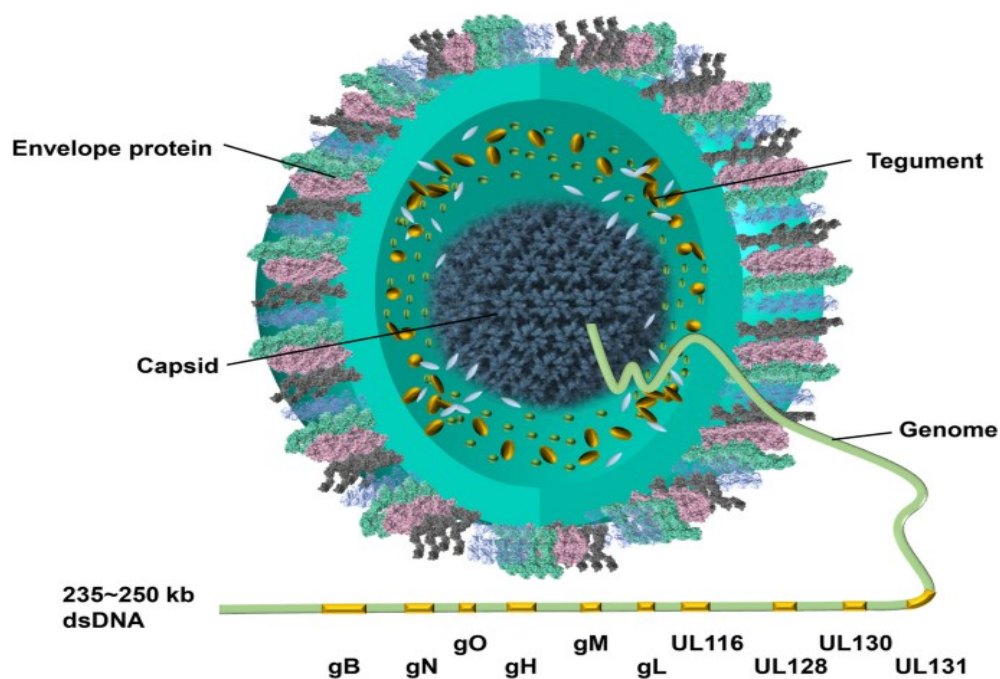


Figura 1. Struttura del virione del HCMV e dei suoi componenti. Il genoma dell'HCMV è incapsulato all'interno del capsidico, circondato dallo strato tegumentale e da un doppio strato lipidico esterno contenente molteplici glicoproteine dell'involucro. La lunghezza del genoma è di circa 235-250 kb e codifica per glicoproteine dell'involucro come gB, gM, gN, gH, gL, gO, UL128, UL130, UL131 e UL116. Fonte: (Shang and Li, 2024).

HCMV è caratterizzato da un ampio tropismo cellulare, che consente l'infezione di diversi tipi cellulari tra cui fibroblasti, cellule epiteliali, endoteliali e mieloidi. Questo ampio spettro di cellule bersaglio è mediato da diversi complessi glicoproteici presenti sull'involucro del virione, responsabili del legame e della fusione con la cellula ospite. Alcune glicoproteine dell'envelope (dell'involucro), come il complesso gM/gN e la glicoproteina gB, sono coinvolte nei meccanismi di ingresso in diversi tipi cellulari e rappresentano componenti strutturali fondamentali del virione. In particolare, gB è una proteina altamente immunogenica e abbondante, capace di indurre robuste risposte anticorpali e linfocitarie T, per questo motivo è stata ampiamente utilizzata come antigene nei candidati vaccinali.

L'ingresso del virus è regolato in maniera più specifica dai complessi contenenti gH/gL, che determinano il tropismo cellulare. In particolare, il complesso pentamerico gH/gL/pUL128-130-131 è essenziale affinché gli isolati clinici di HCMV possano infettare cellule epiteliali, endoteliali e mieloidi. Mutazioni nel locus UL128-131, frequentemente osservate nei ceppi adattati alla coltura *in vitro*, determinano la perdita della capacità di infettare tali cellule, pur mantenendo la possibilità di infettare fibroblasti attraverso il complesso gH/gL "trimero". Dal punto di vista immunologico e vaccinale, è emerso che gli anticorpi diretti contro il complesso pentamerico possiedono un'elevata attività neutralizzante, risultando significativamente più potenti rispetto a quelli diretti contro gB o altri complessi glicoproteici. Inoltre, una risposta anticorpale precoce contro il pentamero è stata associata alla ridotta trasmissione materno-fetale dell'infezione, suggerendo un ruolo cruciale di questi anticorpi nel controllo della disseminazione virale *in vivo*. Alla luce di queste evidenze, lo sviluppo di un vaccino capace di indurre anticorpi neutralizzanti contro il complesso pentamerico rappresenta una strategia prioritaria per la prevenzione dell'infezione da HCMV (Kabanova et al. 2014).

1.2 *Ciclo replicativo*

Il ciclo replicativo del HCMV inizia con l'ingresso del virus nella cellula ospite tramite recettori specifici (Figura 2). Il capsido virale viene trasportato al nucleo, dove il genoma viene rilasciato e le proteine del tegumento modulano le risposte cellulari e attivano la sequenza temporale di espressione genica: geni precoci immediati (IE), geni precoci ritardati (DE) e geni tardivi (L). Successivamente, i capsidi assemblati nel nucleo acquisiscono ulteriori proteine del tegumento e l'involucro nell'area di assemblaggio virale (AC) e vengono rilasciati come particelle infettive. I geni DE sono coinvolti nell'inizio del ciclo

replicativo, ma sono i geni L che permettono l'assemblaggio del capsido nel nucleo e la sua successiva fuoriuscita. Nel citosol il capsido si associa alle proteine del tegumento giunge al complesso di assemblaggio virale per poi essere rilasciato al di fuori della cellula (Jean Beltran and Cristea, 2014).

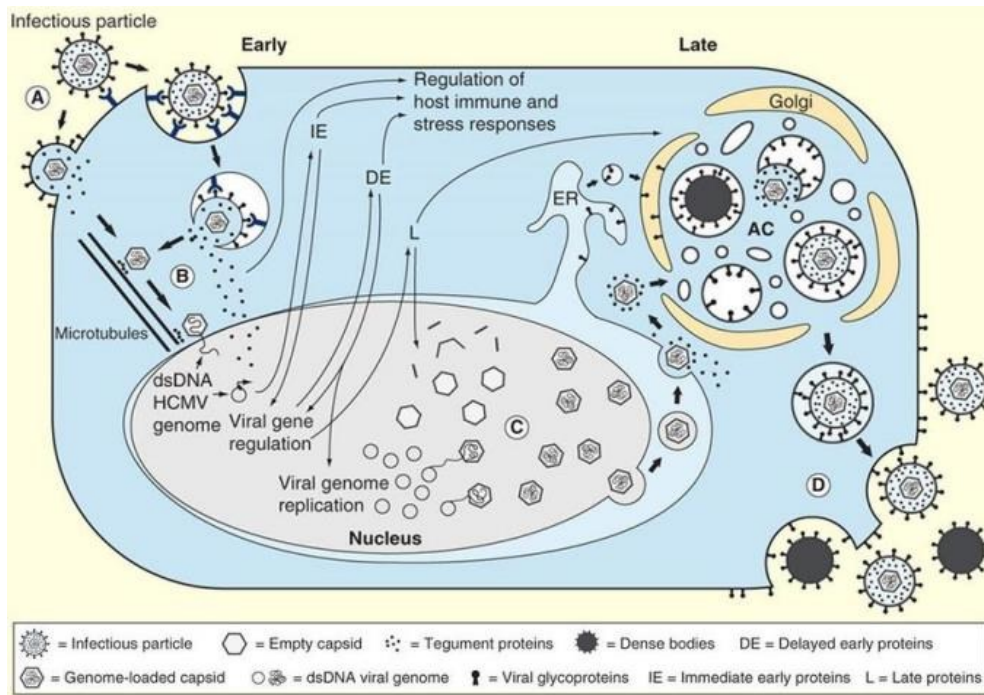


Figura 2. Panoramica del ciclo di vita dell'HCMV. Fonte: (Jean Beltran and Cristea, 2014)

1.3 Latenza del virus

Negli individui sani, l'infezione da HCMV è generalmente asintomatica, mentre negli individui immunocompromessi, come i riceventi di trapianti, l'infezione può rappresentare un rischio significativo e potenzialmente letale (Jean Beltran and Cristea, 2014). Nel midollo osseo, HCMV infetta le cellule progenitrici ematopoietiche, stabilendo in esse uno stato di latenza persistente. Sebbene queste cellule siano progenitori sia della linea linfoide sia di quella mieloide, il virus latente è rilevabile nel sangue principalmente nei monociti, che rappresentano il principale serbatoio della latenza. In questo modo, HCMV sfrutta le cellule della linea mieloide non solo per mantenere una riserva di virus latente, ma anche per garantire la diffusione sistemica durante la fase acuta dell'infezione. La capacità del virus di occupare differenti nicchie biologiche e di modulare il suo stato replicativo, tra latenza e

replicazione litica, è fondamentale per la persistenza dell'infezione nell'ospite e per la diffusione del virus a livello sistemico (Forte et al., 2020). Diversi studi suggeriscono che i meccanismi responsabili della latenza siano attivi subito dopo l'ingresso virale (Figura 3). Un evento chiave consiste nell'inibizione dell'espressione genica litica virale attraverso la repressione del promotore precoce immediato maggiore (MIEP). È stato dimostrato che il meccanismo di repressione sia mediato da diversi fattori, tra cui un ambiente cellulare che inibisce l'attività del MIEP, associato a un'incapacità della proteina chiave del tegumento virale, pp71, di traslocare nel nucleo per transattivare il MIEP. Il mantenimento a lungo termine della latenza e la successiva riattivazione sembrano essere controllati in gran parte da funzioni cellulari intrinseche importanti per il controllo della normale espressione genica. Questi meccanismi includono la struttura della cromatina di ordine superiore e l'attivazione specifica del tipo cellulare delle vie di segnalazione cellulare che controllano l'attività del MIEP (Griffiths et al., 2015).

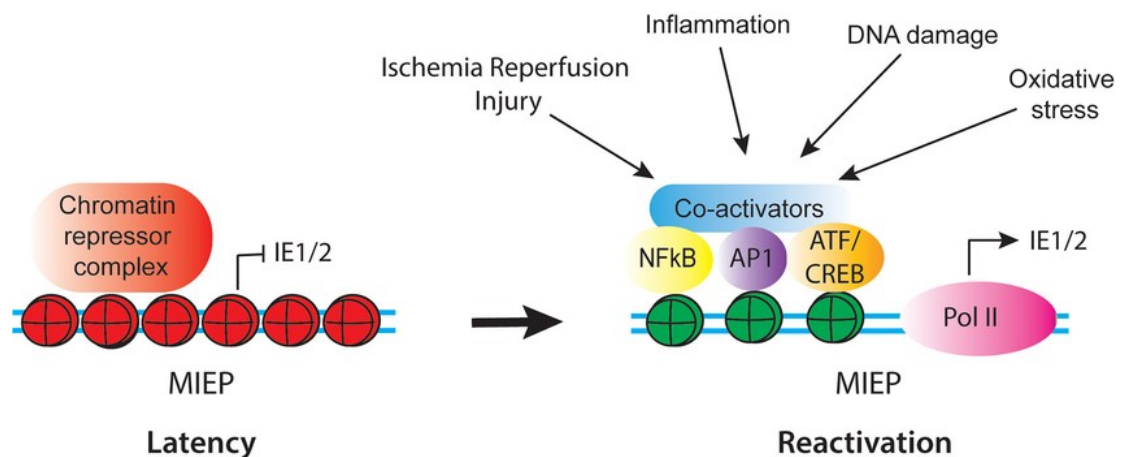


Figura 3. Schema dei fattori regolatori che controllano l'attività del MIEP del CMV in latenza e riattivazione. In latenza, il MIEP è occupato da istoni con modificazione repressiva (rosso) e complessi repressori della cromatina. La riattivazione è innescata dalla riprogrammazione del MIEP, in modo che i repressori vengano sostituiti da fattori di trascrizione attivanti e coattivatori, e gli istoni legati al MIEP acquisiscano modificazione attivante (verde). Stimoli multipli associati a infiammazione e danno cellulare possono portare all'attivazione del MIEP. Fonte: (Forte et al., 2020).

1.4 Immunità e immunoevasione

Il ruolo dell'immunità nell'infezione da HCMV è centrale nel determinare il controllo dell'infezione primaria, l'instaurarsi della latenza e la prevenzione della riattivazione. HCMV non viene eliminato definitivamente, ma resta latente per tutta la vita; infatti, l'equilibrio tra virus e sistema immunitario è dinamico e fondamentale. Il controllo dell'infezione da HCMV richiede l'intervento coordinato sia dell'immunità innata sia dell'immunità adattativa. La risposta immunitaria contro il virus si articola infatti in una fase precoce, mediata principalmente dai meccanismi dell'immunità innata, e in una fase successiva, sostenuta dall'attivazione della risposta adattativa antigene-specifica (Figura 4).

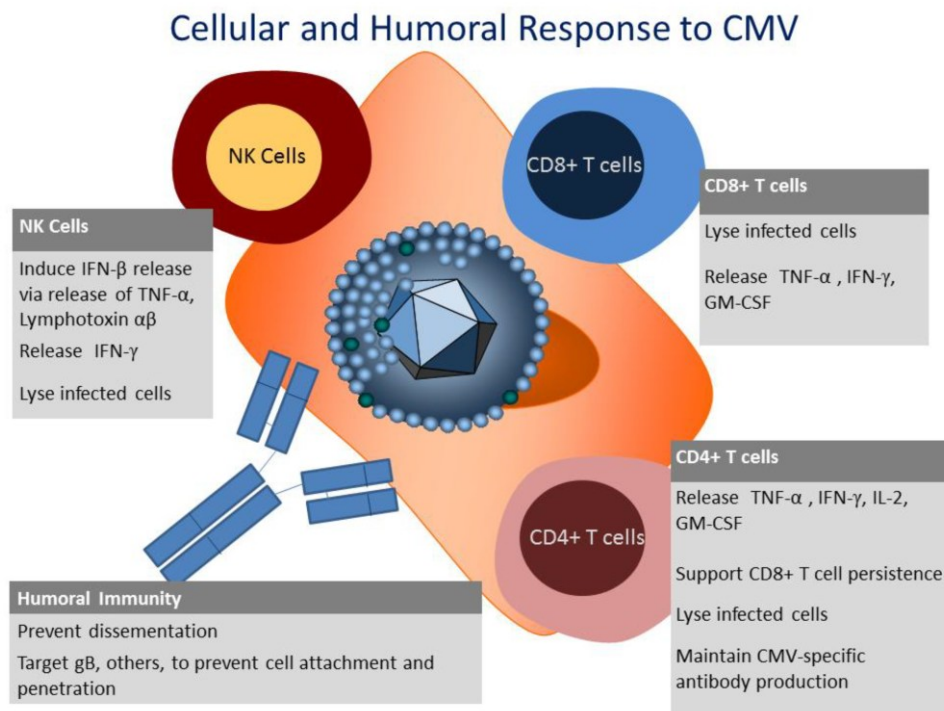


Figura 4. Risposta immunitaria cellulare e umorale contro il citomegalovirus umano (HCMV). Lo schema rappresenta i principali meccanismi della risposta immunitaria innata e adattativa durante l'infezione da HCMV. Le cellule NK contribuiscono al controllo precoce dell'infezione mediante la produzione di IFN- γ e la lisi delle cellule infette. I linfociti T CD8+ esercitano attività citotossica diretta contro le cellule infettate e producono citochine pro-infiammatorie (TNF- α , IFN- γ , GM-CSF), mentre i linfociti T CD4+ supportano il mantenimento e la persistenza della risposta dei CD8+ e la produzione di anticorpi specifici, anch'essi citochine (TNF- α , IFN- γ , IL-2, GM-CSF). L'immunità umorale, mediata dagli anticorpi, contribuisce a prevenire la disseminazione virale, interferendo con l'attacco e la penetrazione del virus nelle cellule bersaglio. (fonte: Hanley and Bollard 2014).

Tra i principali componenti dell'immunità innata, le cellule Natural Killer (NK) rivestono un ruolo centrale. Le NK sono linfociti caratterizzati dall'assenza dei marcatori tipici delle cellule T (CD3) e delle cellule B (CD19) e sono dotate di attività citotossica spontanea nei confronti di cellule infettate da virus o trasformate neoplasticamente. Il loro meccanismo d'azione si basa sull'equilibrio tra segnali attivatori e inibitori, in particolare sul riconoscimento della ridotta espressione delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe I, fenomeno noto come "missing self".

Nel contesto dell'infezione da HCMV, le cellule NK contribuiscono in modo determinante al controllo precoce della replicazione virale attraverso la lisi delle cellule infettate e la produzione di citochine, come l'interferone- γ (IFN- γ), che potenziano la risposta antivirale e favoriscono l'attivazione dell'immunità adattativa. L'importanza delle NK è ulteriormente dimostrata dall'osservazione che pazienti affetti da rari difetti genetici a carico di queste cellule possono sviluppare episodi gravi e ricorrenti di malattia da HCMV (Jackson et al., 2011).

L'immunità adattativa è fondamentale per il controllo della riattivazione del virus a lungo termine. Comprende una componente cellulare, mediata dai linfociti T CD4⁺ e CD8⁺, e una componente umorale, mediata dai linfociti B e dalla produzione di anticorpi specifici. È stata dimostrata la sua importanza per il controllo dell'infezione, come nel caso degli studi sui pazienti che sono andati incontro ad un trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) (Quinnan et al., 1982, Reusser et al., 1991, Lilleri et al., 2008).

Le cellule T CD8⁺ svolgono un ruolo cruciale nel riconoscere ed eliminare le cellule infette da HCMV, tramite i loro recettori TCR che identificano specifici peptidi virali presentati dalle molecole MHC di classe I. Normalmente, questi peptidi derivano dalla degradazione proteasomale delle proteine virali, vengono trasportati nel reticolo endoplasmatico, caricati sulle molecole MHC-I ed esposti sulla superficie cellulare. Tuttavia, HCMV è in grado di interferire con quasi tutti i passaggi di questa via di presentazione, compromettendo il riconoscimento da parte dei CD8⁺ e favorendo la sua sopravvivenza e persistenza nell'ospite (Berry et al., 2020).

Studi derivanti da pazienti sottoposti a HSCT e da individui con infezione primaria da HCMV hanno sottolineato il ruolo cruciale delle cellule T CD4⁺ CMV-specifiche nel controllo della malattia sintomatica. Le cellule T CD4⁺ rappresentano una componente centrale e altamente versatile dell'immunità adattativa. Esse riconoscono gli antigeni virali presentati dalle cellule

presentanti l'antigene (APC) attraverso le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II. Questo processo porta alla formazione della sinapsi immunologica e all'attivazione delle cellule T, che richiede anche segnali co-stimolatori, come quelli mediati da CD28 e CD40L. A seguito dell'attivazione, le cellule T CD4⁺ proliferano, si differenziano e generano popolazioni di memoria a lunga durata. Le cellule T CD4⁺ possono differenziarsi in diversi sottotipi funzionali, tra cui le cellule T helper 1 (Th1), caratterizzate dalla produzione di citochine antivirali come IFN- γ , fondamentali nella risposta contro il HCMV. Inoltre, contribuiscono al controllo dell'infezione sia indirettamente, supportando l'attivazione delle cellule T CD8⁺ e dei linfociti B, sia direttamente, attraverso la produzione di citochine, in alcuni casi, mediante attività citotossica. Nel contesto dell'infezione da HCMV, le cellule T CD4⁺ specifiche mostrano generalmente un fenotipo di memoria altamente differenziato, caratterizzato dalla modulazione di specifici marcatori di superficie. Tra i principali sottotipi di memoria si distinguono le cellule della memoria centrale (T_CM), le cellule della memoria effettrici (T_EM), le cellule T_EMRA e le cellule residenti nei tessuti (T_RM). Queste popolazioni sono essenziali per garantire una risposta immunitaria rapida ed efficace in caso di riattivazione virale. L'espressione di recettori chemiochinici, come CX3CR1, consente alle cellule T CD4⁺ CMV-specifiche di migrare verso siti di infezione, come l'endotelio vascolare attivato (Holtappels et al., 2020).

È ormai noto come le cellule T CD4⁺ svolgano un ruolo chiave nel controllo dell'infezione da HCMV, contribuendo sia al mantenimento della latenza virale sia alla prevenzione della progressione verso forme clinicamente rilevanti, soprattutto nei soggetti immunocompromessi (Lim et al., 2020). Le cellule T CD4⁺ svolgono un ruolo centrale nell'immunità antivirale attraverso tre principali meccanismi: il reclutamento di cellule immunitarie nei siti di infezione, la modulazione della risposta di altre cellule effettrici e l'azione antivirale diretta. Tradizionalmente considerate cellule "helper", esse favoriscono il reclutamento e l'attivazione delle cellule T CD8⁺ mediante la produzione di chemochine, come CCL3 e CCL4, e promuovono l'ingresso di cellule naïve nei linfonodi e il richiamo di cellule effettrici nei siti di replicazione virale attraverso la secrezione di citochine, in particolare IFN- γ . Le cellule T CD4⁺ sono inoltre fondamentali per l'espansione e la funzione dei linfociti B e delle cellule T CD8⁺. Attraverso l'espressione di CD40L, esse interagiscono con il recettore CD40 sulle cellule B, inducendone proliferazione, differenziazione e maturazione nei centri germinativi, con conseguente produzione di anticorpi e formazione di cellule della memoria. Parallelamente, contribuiscono allo sviluppo e al mantenimento delle

cellule T CD8⁺ della memoria mediante la produzione di citochine, come l'IL-2, e attraverso interazioni dirette che ne modulano la sopravvivenza e la funzionalità.

Oltre a queste funzioni di supporto, è ormai ampiamente riconosciuto che le cellule T CD4⁺ possiedono anche un'attività antivirale diretta. Esse possono infatti produrre citochine antivirali, quali IFN- γ e TNF, in grado di inibire la replicazione virale, e, in alcuni casi, esercitare un'azione citotossica diretta mediata da molecole come perforina e Fas. Questo fenotipo citotossico è stato descritto anche nel contesto dell'infezione da HCMV, dove le cellule T CD4⁺ sono in grado di lisare cellule infettate. Dal punto di vista funzionale, la maggior parte delle cellule T CD4⁺ coinvolte nella risposta antivirale appartiene al sottotipo T helper 1 (Th1), caratterizzato dalla produzione di IFN- γ , anche altri sottotipi contribuiscono alla risposta immunitaria. Le cellule T helper follicolari (Tfh) promuovono la risposta anticorpale attraverso la produzione di IL-21 e il supporto ai linfociti B nei centri germinativi, mentre le cellule T regolatorie (Treg) svolgono un ruolo importante nel limitare l'immunopatologia, modulando l'intensità della risposta immunitaria, soprattutto nelle infezioni croniche.

Nel caso dell'infezione da HCMV in individui immunocompetenti, la risposta immunitaria è generalmente efficace nel controllare la replicazione virale, determinando un'infezione spesso asintomatica o autolimitante. Il virus stabilisce una latenza persistente con possibili riattivazioni nel corso della vita dell'individuo. In questo contesto, le cellule T CD8⁺ rappresentano una componente fondamentale per il controllo dell'infezione, ma il loro corretto funzionamento dipende in larga parte dal supporto fornito dalle cellule T CD4⁺. Studi clinici hanno infatti dimostrato che una risposta CD4⁺ inadeguata è associata a una maggiore durata della viremia e a una maggiore severità della malattia, evidenziando il ruolo cruciale di queste cellule nel controllo dell'infezione da HCMV (Holtappels et al., 2020).

Durante l'infezione primaria, le risposte delle cellule T CD4⁺ sono inizialmente meno frequenti e funzionalmente meno mature rispetto a quelle osservate nella fase di memoria, mostrando una minore avidità e una maggiore espressione di molecole inibitorie. Al contrario, nei soggetti sieropositivi, le cellule T CD4⁺ specifiche per il HCMV presentano un fenotipo di memoria altamente differenziato e multifunzionale, in grado di garantire un controllo efficace della riattivazione virale. Dal punto di vista della specificità antigenica, le cellule T CD4⁺ riconoscono un'ampia gamma di antigeni virali, inclusi quelli derivati da proteine immunodominanti come pp65 e IE1, ma anche numerose altre proteine strutturali e regolatorie di HCMV. La valutazione funzionale di queste cellule si basa prevalentemente

sulla loro capacità di produrre citochine, in particolare IFN- γ , ma studi più recenti hanno dimostrato anche la loro capacità di limitare direttamente la diffusione virale *in vitro*. Alcune sottopopolazioni di cellule T CD4⁺ specifiche per HCMV possono svolgere funzioni regolatorie, producendo citochine immunosoppressive come l'IL-10. Queste cellule contribuiscono al bilanciamento della risposta immunitaria, limitando il danno tissutale ma potenzialmente favorendo la persistenza virale. Nel complesso, tali evidenze sottolineano la complessità e la versatilità delle cellule T CD4⁺ nella risposta immunitaria contro HCMV, evidenziandone il ruolo chiave sia nel controllo dell'infezione sia nella regolazione dell'equilibrio tra immunità e immunopatologia (Holtappels et al., 2020).

Per contro, HCMV ha sviluppato sofisticati meccanismi di evasione immunitaria per sfuggire al riconoscimento e all'eliminazione da parte del sistema immunitario (Figura 5). Il virus è infatti in grado di codificare numerose molecole virali, che prendono il nome di immunoevasine; queste molecole interferiscono con le funzioni dei linfociti T e delle cellule NK attraverso diversi meccanismi, modulando così la risposta immunitaria dell'ospite (Berry et al., 2020).

Le immunoevasine codificate da HCMV possono essere suddivise nelle seguenti tre categorie principali, sulla base della loro somiglianza con i ligandi cellulari e del loro meccanismo d'azione molecolare:

- Mimetici molecolari, che imitano strutturalmente i ligandi endogeni dell'ospite.
- Immunoevasine convergenti, che agiscono su bersagli cellulari simili pur non essendo strutturalmente correlate ai ligandi naturali.
- Leganti alternativi, che interagiscono con i recettori immunitari attraverso modalità differenti rispetto ai ligandi fisiologici.

È importante sottolineare che questa classificazione rappresenta una semplificazione di un sistema altamente complesso. Infatti, più *immunoevasine* possono agire simultaneamente sulla stessa molecola, mentre una singola immunoevasina può svolgere diverse funzioni immunomodulatorie (Berry et al., 2020).

Un importante meccanismo di evasione consiste nel bloccare il processamento dei peptidi virali. Infatti, le cellule T CD8⁺ svolgono un ruolo fondamentale nel riconoscimento e nell'eliminazione delle cellule infettate da HCMV. Questo processo avviene grazie ai recettori delle cellule T (TCR), che riconoscono specificamente i peptidi virali presentati

sulla superficie cellulare dalle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC-I).

Nelle cellule infettate, i peptidi antigenici derivano dalla degradazione proteasomiale delle proteine virali nel citosol. Successivamente, tali peptidi vengono trasportati nel reticolo endoplasmatico, dove vengono caricati sulle molecole MHC-I. Il complesso peptide–MHC-I viene quindi trasportato alla superficie cellulare attraverso la via secretoria, consentendo il riconoscimento da parte delle cellule T CD8⁺. Per evitare questo riconoscimento immunitario, il HCMV ha evoluto diversi meccanismi di evasione che interferiscono con quasi tutte le fasi della via di presentazione dell'antigene mediata da MHC-I, compromettendo così la capacità delle cellule T CD8⁺ di identificare ed eliminare le cellule infette (Berry et al., 2020).

Uno dei principali meccanismi di immunoevasione dell'HCMV consiste nella modulazione della presentazione dell'antigene mediata dalle molecole MHC-I. In particolare, il virus riduce l'espressione di queste molecole sulla superficie cellulare e interferisce con il legame tra i peptidi virali e l'MHC-I modulando l'espressione dei geni appartenenti alla regione *US (Unique Short)* del genoma virale, tra cui *US2*, *US3*, *US6*, *US10* e *US11* (Griffiths et al., 2015).

Le proteine US2 e US11 promuovono la retro-traslocazione delle catene pesanti dell'MHC-I dal reticolo endoplasmatico al citosol, dove vengono successivamente degradate dal proteasoma. La proteina US3, invece, trattiene le molecole MHC-I all'interno del reticolo endoplasmatico, impedendone il trasporto verso la superficie cellulare. Infine, US6 inibisce il caricamento dei peptidi sulle molecole MHC-I bloccando il trasporto dei peptidi nel reticolo endoplasmatico attraverso l'inibizione del trasportatore TAP (Park et al., 2002).

Il trasporto dei peptidi nel reticolo endoplasmatico e il loro caricamento sulle molecole MHC-I sono mediati da un complesso multiproteico dinamico noto come *complesso di caricamento peptidico*. Questo complesso include il trasportatore peptidico *TAP* (formato da due subunità TAP1 e TAP2), le proteine chaperon *tapasina* e *calreticulina*, e l'ossidoreduttasi *ERp57*, che cooperano per facilitare l'assemblaggio e il corretto caricamento dei peptidi sull'MHC-I.

L'HCMV interferisce con questo sistema attraverso diverse proteine virali. In particolare, US3 trattiene le molecole MHC-I nel reticolo endoplasmatico legandosi alla *tapasina* e impedendo il caricamento dei peptidi. Un ulteriore meccanismo è mediato dalla glicoproteina US6, che blocca il trasporto dei peptidi nel reticolo endoplasmatico legandosi alla subunità

TAP1. Questa interazione impedisce i cambiamenti conformazionali di TAP dipendenti dall'ATP, necessari per la traslocazione dei peptidi dal citosol al reticolo endoplasmatico (Berry et al., 2020).

Per evadere la risposta immune mediata dalle cellule Natural Killer (NK), HCMV ha sviluppato diversi meccanismi di evasione immunitaria. Il virus esprime infatti proteine virali in grado di interferire con i segnali che normalmente conducono all'attivazione delle NK. In particolare, la proteina UL18 agisce come un omologo delle molecole MHC di classe I e interagisce con i recettori inibitori presenti sulle cellule NK, trasmettendo segnali che ne riducono l'attività citotossica. Analogamente, la proteina UL40 favorisce l'espressione di HLA-E sulla superficie cellulare, una molecola riconosciuta dai recettori inibitori delle cellule NK, contribuendo così alla soppressione della loro attivazione. Inoltre, altre proteine virali, tra cui UL16 e UL142, riducono l'espressione di specifici ligandi attivatori necessari per il riconoscimento delle cellule infette da parte delle cellule NK. Attraverso questi meccanismi, HCMV limita l'attivazione e la funzione effettrice delle cellule NK, favorendo la persistenza virale e la diffusione dell'infezione nell'ospite.

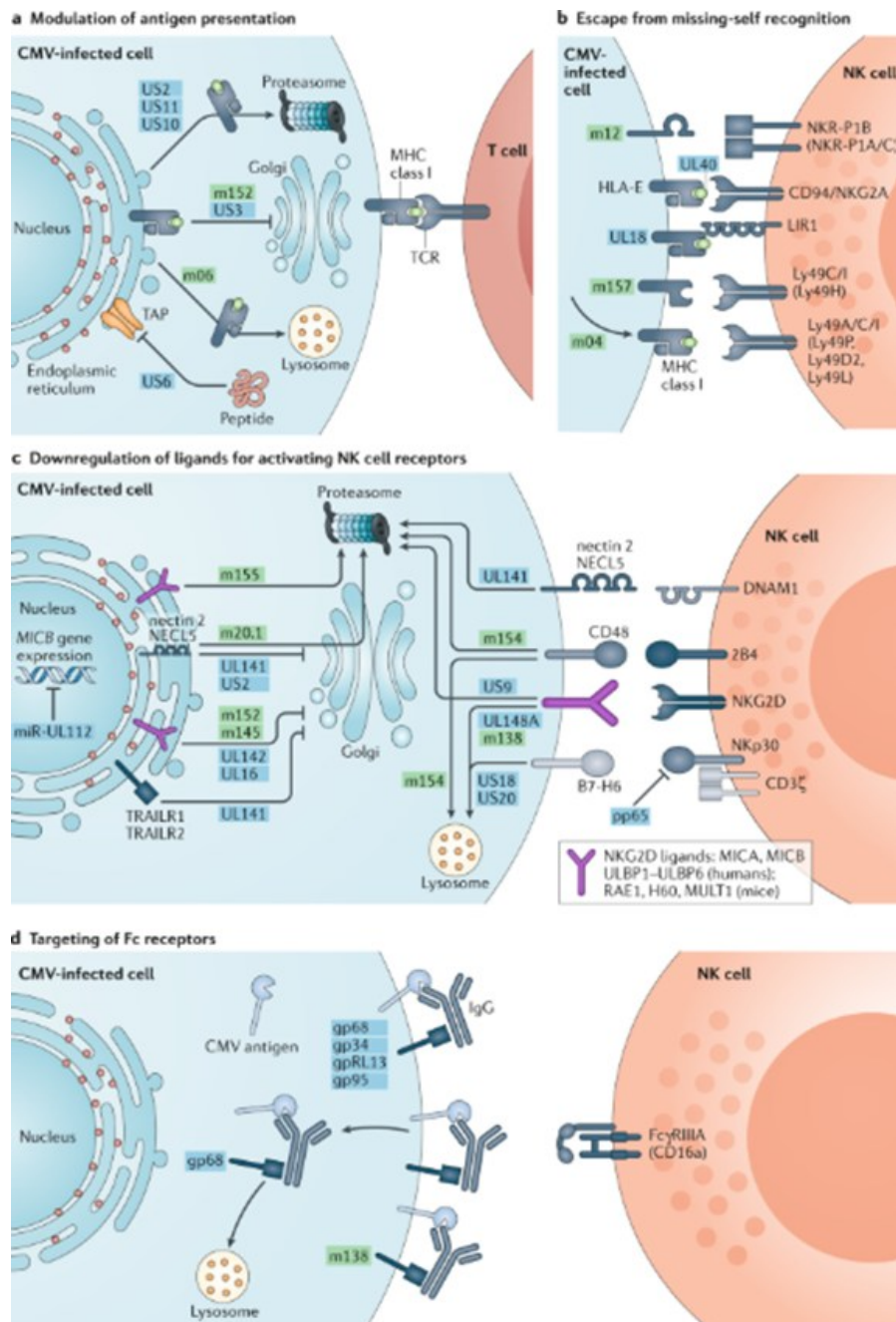


Figura 5. Meccanismi di immunoevasione del CMV. Le immunoevasine virali modulano la risposta immunitaria interferendo con la presentazione dell'antigene (a), sfuggendo al riconoscimento del "missing-self" (b), regolando negativamente i ligandi dei recettori NK (c) e inibendo la segnalazione del recettore Fc (d). Le proteine dell'ospite sono in grigio/nero, le immunoevasine del CMV umano in blu e quelle del CMV murino in verde. Fonte: (Berry et.al.2020).

2 LA DIAGNOSI DELL'INFEZIONE DA HCMV E GLI ASPETTI CLINICI

2.1 Diagnosi

Tra i vari metodi utilizzati per la diagnosi di infezioni/malattia da HCMV si ricordano storicamente l'isolamento convenzionale del virus nei fibroblasti polmonari embrionali umani (HELFI); l'isolamento rapido su shell-vial che sfrutta anticorpi monoclonali in immunofluorescenza (IFA) o con la reazione immunoperossidasi (IPA) per la rilevazione dell'antigene immediato-precocce p72 nel nucleo dei fibroblasti infettati; la rilevazione dell'antigene pp65 (antigenemia) nei nuclei dei leucociti del sangue periferico utilizzando un pool di MAbs pp-65 specifici in IFA o IPA e la quantificazione dei leucociti positivi. Ad oggi il gold standard è la quantificazione della carica virale nel sangue attraverso tecniche basate sulla PCR real-time che superano le limitazioni dei leucociti positivi per l'antigene pp65, quali il fatto di non poter essere utilizzato in pazienti leucopenici (come durante la fase di attecchimento), di non essere automatizzabile e di non correlare direttamente con l'effettiva replicazione virale (Gerna et al., 2011).

2.1.1 Diagnosi sierologica

I test sierologici valutano l'esposizione pregressa o recente al virus mediante la rilevazione di anticorpi anti-CMV:

IgG anti-CMV indicano un'infezione pregressa o immunità.

IgM anti-CMV possono suggerire un'infezione recente o riattivazione, ma presentano limiti di specificità e possono dare falsi positivi, persistendo per mesi dopo l'infezione primaria.

I test di avidità IgG aiutano a distinguere infezioni recenti da infezioni preesistenti, in quanto gli anticorpi maturano e aumentano di avidità nel tempo (Dollard et al., 2011).

Il test immunoenzimatico *ELISA* rappresenta il metodo sierologico più comune per rilevare anticorpi contro HCMV. In questo test, gli antigeni virali vengono immobilizzati su una fase solida, e il siero del paziente viene aggiunto. Gli anticorpi specifici anti-HCMV presenti nel siero si legano agli antigeni, e successive reazioni enzimatiche producono un cambiamento di colore proporzionale alla concentrazione anticorpale. Il test ELISA consente quindi una misurazione quantitativa dei livelli di anticorpi, risultando uno strumento rapido e standardizzato per lo screening sierologico.

Un altro metodo sierologico utile è il test di immunofluorescenza *IFA*, che utilizza anticorpi fluorescenti per rilevare le immunoglobuline specifiche per HCMV nei campioni dei

pazienti. Questo test è spesso utilizzato per confermare i risultati ELISA positivi e distinguere tra anticorpi IgM e IgG. (Maresca et al., 2023).

2.1.2 Diagnosi virologica diretta

Coltura cellulare diretta. La coltura convenzionale utilizza campioni inoculati su fibroblasti umani e richiede 2–3 settimane per il risultato. Il test Shell Vial, in una versione accelerata, utilizza centrifugazione e immunofluorescenza per rilevare antigeni virali immediati-precoci (IE) già dopo 16 ore, consentendo uno screening più rapido e adatto a numerosi campioni.

Antigenemia. Il test rileva la proteina virale pp65 nei leucociti del sangue periferico mediante immunofluorescenza. Fornisce sia informazioni qualitative che quantitative, correlando la presenza di virus con la gravità della malattia nei pazienti immunodepressi. È un test laborioso, poco automatizzabile e meno affidabile nei pazienti neutropenici, poiché richiede un numero sufficiente di leucociti.

PCR e RT-PCR. La PCR rileva il DNA virale in sangue, plasma, urine, fluidi corporei o tessuti, con elevata sensibilità e rapidità. Può essere qualitativa o quantitativa (Real-Time PCR), permettendo il monitoraggio della carica virale nei soggetti a rischio e la valutazione della risposta al trattamento. La RT-PCR individua l'mRNA virale, indicativo di infezione attiva e sintomatica, anche se risulta meno sensibile rispetto a PCR e antigenemia pp65 (Dollard et al., 2011).

RNAemia (mRNA virale). L'amplificazione di mRNA virali (in particolare unspliced mRNA di geni immediati precoci) rappresenta un marcatore di infezione replicativa attiva e di malattia da HCMV. Nuove metodiche di amplificazione sono in sviluppo per garantire affidabilità anche in presenza di un background di DNA virale.

Esame istopatologico che prevede l'analisi con colorazione ematossilina-eosina (H&E) di campioni biotici, per identificare il caratteristico effetto citopatico: nucleo con inclusione basofila circondata da alone chiaro, che conferisce il tipico aspetto "a occhio di civetta". L'interpretazione richiede un patologo esperto. La dimostrazione istopatologica di inclusioni virali, associata a un quadro clinico compatibile, costituisce il "gold standard" per la diagnosi di malattia d'organo da HCMV (es. colite, polmonite, epatite), come riconosciuto dalle linee guida internazionali.

Monitoraggio dell'immunità cellulo-mediata (CMI) specifica per HCMV, test raccomandato dalle ultime linee guida internazionali perché utile nel valutare il rischio di riattivazione o malattia da HCMV (es. predire chi controllerà spontaneamente l'infezione dopo fine profilassi o sospensione terapia); supportare decisioni sulla durata della profilassi o della terapia pre-emptive (es. valutare se sia "sicuro" interrompere in pazienti ad alto rischio); interpretare DNAemie a basso livello (distinguere pazienti che controllano versus quelli che evolveranno verso malattia). Purtroppo, ad oggi, presenta come limiti la mancanza di standardizzazione tra laboratori e saggi e l'assenza di cut-off prognostici non uniformemente definiti.

2.2 *Quadri clinici dell'infezione da HCMV*

2.2.1 *Infezione nei pazienti immunocompetenti*

Nei pazienti immunocompetenti, HCMV causa in genere una malattia asintomatica o sindromi simil-mononucleosiche o simil-influenzali lievi o moderate, caratterizzate da sintomi quali malessere, febbre, linfadenopatia e artralgia che persistono per circa 2-6 settimane (Xia et al., 2025). Sebbene questa sindrome possa manifestarsi a tutte le età, è più comune nei giovani adulti sessualmente attivi. Mialgie, cefalea e splenomegalia sono i sintomi più comunemente riscontrati. Meno comuni sono la polmonite interstiziale o segmentaria, la miocardite, la pleurite, l'artrite, la trombosi venosa splancnica e l'encefalite. In rari casi, può verificarsi la sindrome di Guillain-Barré (Loscalzo, 2022).

2.2.2 *Infezione congenita*

Un aspetto di particolare rilevanza dell'infezione da HCMV è la trasmissione materno-fetale durante la gravidanza, che può portare allo sviluppo di infezione congenita. Questa condizione rappresenta la più frequente infezione virale congenita ed è associata a possibili complicanze neurologiche e uditive nel neonato.

Si stima che ogni anno circa lo 0,5–2,5% dei neonati nasca con infezione congenita da citomegalovirus (cCMV), rendendo questa patologia un importante problema di sanità pubblica a livello globale. L'infezione congenita da HCMV rappresenta, infatti, la principale causa non genetica di perdita dell'udito e una delle più rilevanti cause di disabilità neurologiche in età pediatrica, interessando circa l'8–21% dei soggetti infetti. Sebbene molti neonati infetti risultino asintomatici alla nascita, circa il 20% può sviluppare sequele

neurologiche nel corso della crescita, tra cui paralisi cerebrale, disabilità intellettiva, crisi epilettiche e patologie oculari congenite. Inoltre, fino al 25% dei bambini inizialmente asintomatici può sviluppare una perdita uditiva a esordio tardivo entro i primi quattro anni di vita. L'infezione congenita da HCMV può inoltre contribuire in modo significativo alla mortalità fetale prenatale (Rybak-Krzyszowska et al., 2023).

La trasmissione del HCMV dalla madre al figlio, definita trasmissione verticale, può avvenire in utero, durante il parto oppure nel periodo postnatale attraverso l'allattamento al seno. La trasmissione intrauterina è generalmente attribuita al passaggio transplacentare del virus, che successivamente può replicarsi in diversi tessuti embrionali o fetali (Fisher et al., 2000). La trasmissione durante il parto e postnatale può invece verificarsi attraverso l'ingestione o l'aspirazione di secrezioni cervicovaginali durante il parto, oppure tramite il contatto con secrezioni infette e il latte materno durante l'allattamento. La trasmissione in utero determina un'infezione congenita, che comporta un rischio significativamente maggiore di sequele rispetto alle infezioni acquisite durante il parto o nel periodo postnatale. Il rischio di trasmissione intrauterina è più elevato quando la madre sviluppa una infezione primaria da HCMV durante la gravidanza, rispetto ai casi di infezione non primaria, come riattivazione virale o reinfezione con un nuovo ceppo (Davis et al., 2017).

È stato osservato che, mentre la gravità delle sequele fetali tende a diminuire con il progredire della gestazione, il rischio di trasmissione al feto aumenta nelle fasi più avanzate della gravidanza, passando da circa il 40% nei primi due trimestri fino al 60% o più nel terzo trimestre (Bodeus et al., 1999; Pass et al. 2006; Revello et al., 2011; Picone et al., 2013). Tuttavia, anche un'infezione primaria materna che si verifica nel periodo preconcezionale (tra tre mesi e tre settimane prima del concepimento) o nel periodo periconcezionale (nelle tre settimane precedenti e successive al concepimento) è stata associata a un aumento del rischio di trasmissione intrauterina del virus, stimato rispettivamente intorno al 5% e al 16% (Picone et al., 2013).

Sebbene la presenza di anticorpi materni preesistenti contro il HCMV rappresenti il principale fattore protettivo nei confronti dell'infezione congenita, essa non elimina completamente il rischio di trasmissione (Boppana et al., 1999). In tali casi, l'infezione fetale può derivare dalla riattivazione di un virus latente nella madre oppure da reinfezione con un differente ceppo virale. È stato inoltre dimostrato che più ceppi virali possono essere trasmessi al feto, sia attraverso un singolo evento di trasmissione con ceppi co-circolanti sia mediante eventi multipli di trasmissione successivi (Dollard et al., 2011).

Le principali fonti di infezione primaria materna da HCMV sono rappresentate dall'attività sessuale e dal contatto stretto con bambini piccoli (Fowler & Pass, 2006). La trasmissione del virus può avvenire attraverso contatto diretto o indiretto con fluidi corporei infetti, tra cui sperma, secrezioni cervicali o vaginali, saliva, urina e prodotti ematici.

In particolare, la trasmissione orizzontale da bambino a bambino o da bambino ad adulto rappresenta una modalità frequente di diffusione del virus, soprattutto in contesti comunitari come asili nido e scuole dell'infanzia. In questi ambienti il contagio avviene verosimilmente attraverso il contatto con saliva o urina infette presenti sulle mani, sugli oggetti o sui giocattoli, facilitando così la diffusione del virus tra i bambini e, successivamente, verso gli adulti che se ne prendono cura (Davis, King and Kourtis, 2017). Durante il periodo antenatale l'infezione può essere sospettata sulla base della sierconversione materna, della presenza di IgM anti-HCMV associata ad IgG a bassa avidità, delle manifestazioni cliniche della madre oppure attraverso segni non specifici all'ecografia. In questo periodo la conferma dell'infezione avviene con l'identificazione del virus nel liquido amniotico tramite PCR (Nicloux et al., 2020).

Nei neonati, i segni clinici indicativi di cCMV includono basso peso per età gestazionale, perimetro cranico inferiore al 10° percentile e manifestazioni cliniche o biologiche di diffusione virale, quali: epatosplenomegalia, ittero precoce, porpora, polmonite, anomalie neurologiche, trombocitopenia, neutropenia, citolisi epatica e iperbilirubinemia mista. I neonati con basso peso alla nascita senza altre anomalie vengono considerati asintomatici o lievemente sintomatici, poiché il ridotto peso può essere secondario a placentite da HCMV. Nei neonati sospettati di cCMV è raccomandata una valutazione audiologica e clinica completa per identificare eventuali perdita uditiva o segni clinici suggestivi. Lo screening uditivo neonatale universale, adottato nella maggior parte dei paesi sviluppati, consente di rilevare i bambini con perdita uditiva già presente alla nascita (Nicloux et al., 2020).

La diagnosi postnatale di cCMV si basa sul rilevamento del virus alla nascita, tramite PCR su saliva (prima dell'allattamento) o su urine raccolte nelle prime tre settimane di vita. Questo consente di distinguere l'infezione congenita da eventuali infezioni secondarie acquisite dall'ambiente o dal latte materno. L'identificazione del virus nella saliva tramite PCR, prima che sia iniziato l'allattamento al seno, è utile come screening ma l'eventuale positività della saliva deve sempre essere confermata mediante analisi delle urine (Nicloux et al., 2020).

2.2.3 Infezione nei pazienti immunocompromessi

I pazienti immunocompromessi sono individui il cui sistema immunitario presenta una funzione ridotta o alterata, rendendoli più suscettibili alle infezioni e meno capaci di controllare la replicazione virale. L'immunocompromissione può essere primaria (congenita), dovuta a difetti genetici del sistema immunitario, o secondaria (acquisita), come nel caso del trapianto di organi o di midollo.

L'infezione da HCMV risulta una grave complicanza nei pazienti sottoposti a trapianto di organo solido (SOTR) e anche nei pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT). È stata verificata la viremia in circa un terzo dei riceventi di HSCT; il rischio di malattia grave può essere ridotto mediante profilassi o terapia preventiva con farmaci antivirali. Il rischio è maggiore nei primi 100 giorni dopo il trapianto. Le sindromi prodotte dal HCMV in ospiti immunocompromessi ("sindrome da HCMV") spesso iniziano con affaticamento, febbre, malessere, anoressia, sudorazioni notturne e artralgie o mialgie. Durante questi episodi possono essere osservate anomalie della funzionalità epatica, leucopenia, trombocitopenia e linfocitosi atipica. Senza trattamento, l'infezione da HCMV può progredire verso una malattia d'organo più grave. Lo sviluppo di tachipnea, ipossiemia e tosse non produttiva segnala il coinvolgimento respiratorio (Loscalzo, 2022). La sindrome da HCMV probabile viene definita dalla presenza di HCMV nel sangue, rilevato tramite isolamento virale, coltura rapida, antigenemia o test molecolari (NAT), associata ad almeno due dei seguenti criteri clinico-laboratoriali (Ljungman et al., 2017):

- Febbre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ per almeno due giorni.
- Malessere o affaticamento nuovo o peggiorato.
- Leucopenia o neutropenia, confermata in due misurazioni separate ($\text{WBC} < 3500/\mu\text{L}$ se la conta precedente era $\geq 4000/\mu\text{L}$, oppure riduzione $>20\%$ se la conta precedente era $< 4000/\mu\text{L}$; neutrofili $< 1500/\mu\text{L}$ o riduzione $>20\%$).
- Linfociti atipici $\geq 5\%$.
- Trombocitopenia, definita come conta piastrinica $< 100.000/\mu\text{L}$ o riduzione $>20\%$ rispetto alla conta basale.
- Aumento delle aminotransferasi epatiche (ALT o AST).

Questa definizione permette di identificare i pazienti a rischio di progressione verso malattia d'organo da HCMV, pur in assenza di manifestazioni specifiche di organo-target (Ljungman et al., 2017). L'infezione da HCMV rappresenta una delle principali complicanze nei pazienti sottoposti a HSCT. La riattivazione virale nel periodo post-trapianto precoce è

associata a una significativa riduzione della sopravvivenza dei riceventi, indipendentemente dalla recidiva della neoplasia di base. La riattivazione di HCMV si verifica in circa il 40–50% dei riceventi di HSCT. Diversamente dai trapianti di organi solidi (SOTR), nei riceventi HSCT lo stato sierologico del ricevente è il principale fattore predittivo di rischio: i gruppi D+/R+ e D-/R+ presentano un rischio simile, mentre D+/R- è a rischio intermedio (Britt and Prichard, 2018).

L'infezione da HCMV nei riceventi HSCT può rimanere asintomatica oppure evolvere verso malattia d'organo grave, fino al decesso. Per distinguere i pazienti a basso rischio da quelli che svilupperanno la malattia è necessario un monitoraggio virologico quantitativo frequente. La malattia d'organo più grave nei riceventi HSCT è la polmonite da HCMV, responsabile di circa il 30% dei casi di malattia d'organo terminale, con mortalità che può raggiungere il 50% in alcune popolazioni (Erard et al., 2015; Travi and Pergam, 2014). La gravità della malattia è strettamente correlata a deficit nell'immunità adattativa, in particolare a carenza di linfociti T specifici per HCMV. La diagnosi del HCMV nei pazienti trapiantati si basa sulla quantificazione del DNA virale su sangue, tessuti o lavaggio broncoalveolare (BAL) (Gerna et al., 2011).

3 TRAPIANTO CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE (HSCT)

Il trapianto di cellule staminali ematopoietiche è diventato un trattamento salvavita per molti pazienti con disordini congeniti, malattie del sistema ematopoietico, patologie neoplastiche ed autoimmuni (Tabella 1) (Appelbaum, 2007, Copelan, 2006).

Le cellule staminali ematopoietiche (HSC) rappresentano una popolazione cellulare fondamentale per il mantenimento dell'ematopoiesi durante tutta la vita dell'individuo. Queste cellule sono caratterizzate da due proprietà principali: la capacità di autorinnovamento (*self-renewal*), che consente loro di mantenere stabile il pool di cellule staminali nel tempo, e la capacità di differenziarsi in cellule progenitrici impegnate (*committed*), destinate a generare le diverse linee cellulari del sangue. Le HSC sono localizzate principalmente nel midollo osseo, ma possono essere presenti anche nel sangue periferico e nel sangue del cordone ombelicale. Attraverso un processo gerarchico di differenziamento, queste cellule danno origine a progenitori ematopoietici che successivamente maturano nei diversi elementi figurati del sangue, tra cui eritrociti, leucociti e piastrine. Grazie a queste caratteristiche, le HSC svolgono un ruolo essenziale nel garantire il continuo rinnovamento e la funzionalità del sistema ematopoietico (Zhao et al., 2021).

A seconda della fonte delle cellule e della relazione tra donatore e ricevente, i trapianti possono essere *allogenici* (da donatore compatibile) o *autologhi* (dal paziente stesso). Gli HSCT allogenici offrono il vantaggio della possibilità di un effetto “*graft-versus-leukemia*”, infatti le cellule immunitarie del donatore riconoscono le cellule leucemiche residue del paziente come estranee e le attaccano. Questo è un sistema vantaggioso perché può ridurre il rischio di recidiva della leucemia, aiutando a eliminare cellule tumorali che la chemioterapia non ha rimosso. È un metodo che comporta un rischio maggiore di complicanze immunologiche, come la malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD), e di infezioni opportunistiche, tra cui quelle da citomegalovirus umano (HCMV).

Il successo del trapianto dipende da molteplici fattori, tra cui lo stato immunologico del paziente, la compatibilità HLA con il donatore e la gestione delle complicanze infettive e immunologiche post-trapianto. HSCT rappresenta una delle prime forme di terapia cellulare sviluppate ed è tuttora considerato una strategia terapeutica fondamentale nel trattamento di numerose neoplasie ematologiche. Tuttavia, il trapianto allogenico è associato a una significativa tossicità e può essere seguito da diverse complicanze post-trapianto che possono coinvolgere vari organi. In alcuni casi, tali complicanze possono essere gravi e contribuire alla mortalità correlata al trattamento. Un altro aspetto che, insieme alla tossicità, riduce il tasso di successo della tecnica di trapianto è la recidiva di neoplasie ematologiche sottostanti (Milone et al., 2025).

Il trapianto autologo è una procedura che si articola in due fasi principali: l'utilizzo di chemioradioterapia ad alte dosi per eliminare le cellule del tumore e la successiva reinfusione delle cellule ematopoietiche staminali precedentemente prelevate dallo stesso paziente. Rispetto al trapianto allogenico quello autologo è gravato da un relativamente basso tasso di mortalità trapianto correlata (Copelan, 2006).

Un aspetto non secondario è la valutazione del ricevente. Un'anamnesi accurata verte sui precedenti trattamenti farmacologici e radianti, lo stato della malattia al trapianto, l'età, lo stato psichico e la presenza o meno di supporto familiare. Un parametro frequentemente utilizzato è il Sorrow score per definire il rischio trapiantologico del paziente. Viene posta una grande attenzione a questa fase dell'iter di trattamento in quanto questi fattori impattano sulla buona riuscita del trapianto (Rugarli, 2021).

Table 1. Diseases Commonly Treated with Hematopoietic Stem-Cell Transplantation.

Autologous transplantation*

Cancers

- Multiple myeloma
- Non-Hodgkin's lymphoma
- Hodgkin's disease
- Acute myeloid leukemia
- Neuroblastoma
- Ovarian cancer
- Germ-cell tumors

Other diseases

- Autoimmune disorders
- Amyloidosis

Allogeneic transplantation†

Cancers

- Acute myeloid leukemia
- Acute lymphoblastic leukemia
- Chronic myeloid leukemia
- Myelodysplastic syndromes
- Myeloproliferative disorders
- Non-Hodgkin's lymphoma
- Hodgkin's disease
- Chronic lymphocytic leukemia
- Multiple myeloma
- Juvenile chronic myeloid leukemia

Other diseases

- Aplastic anemia
- Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria
- Fanconi's anemia
- Blackfan–Diamond anemia
- Thalassemia major
- Sickle cell anemia
- Severe combined immunodeficiency
- Wiskott–Aldrich syndrome
- Inborn errors of metabolism

Tabella 1. Numerose patologie sono trattate con il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT). Fonte: (Copelan, 2006).

3.1 *Complicanze associate al trapianto*

HSCT è associato a una serie di complicanze cliniche che possono avere un impatto significativo sulla morbilità e sulla mortalità dei pazienti. I primi 100 giorni dopo il trapianto rappresentano il periodo di maggior rischio per lo sviluppo di complicanze, a causa dell'intensa immunosoppressione, della neutropenia e del condizionamento pre-trapianto (Copelan, 2006).

Le complicanze post-trapianto possono essere generalmente classificate in due categorie in base al momento della loro insorgenza:

- *Complicanze precoci (early)*: si manifestano subito dopo il trapianto e includono principalmente infezioni batteriche, virali o fungine, cistite emorragica, trombocitopenia grave e la malattia del trapianto acuta contro l'ospite (aGVHD).
- *Complicanze tardive (late)*: compaiono oltre i 100 giorni dal trapianto e comprendono malattia del trapianto cronica contro l'ospite (cGVHD), disfunzioni d'organo a lungo termine, infezioni ricorrenti o tardive, complicanze endocrine e malattie neoplastiche secondarie.

Questa distinzione temporale è fondamentale per la gestione clinica e il follow-up dei pazienti, poiché consente di programmare sorveglianza mirata e interventi preventivi mirati sia nel periodo immediatamente successivo al trapianto sia a lungo termine.

In passato qualsiasi manifestazione di GVHD presente a 100 giorni o più dal trapianto di cellule staminali ematopoietiche veniva classificata automaticamente come cGVHD, anche se i sintomi erano simili a quelli della forma aGVHD. Tuttavia, negli ultimi due decenni i progressi nella pratica dell'HSCT hanno modificato sia la presentazione sia l'evoluzione naturale della GVHD acuta e cronica, mettendo in discussione le definizioni basate esclusivamente sul tempo di insorgenza. Oggi si riconosce che la distinzione tra GVHD acuta e cronica deve basarsi principalmente sulle manifestazioni cliniche, piuttosto che sul momento in cui compaiono i sintomi. Ad esempio:

- La aGVHD può comparire anche oltre i 3 mesi nei pazienti sottoposti a condizionamento a intensità ridotta.
- Le manifestazioni di GVHD acuta e cronica possono coesistere contemporaneamente, come nei pazienti trattati con DLI (Donor Lymphocyte Infusion).

Secondo il consenso attuale:

- I segni e sintomi diagnostici della cGVHD sono quelli sufficienti per confermare la diagnosi senza ulteriori test.

- I segni e sintomi distintivi della cGVHD sono manifestazioni che non si osservano normalmente nella aGVHD, ma da soli non bastano per confermare la diagnosi.
- Le altre caratteristiche includono segni rari, controversi o aspecifici, che non sono diagnostici da soli.
- Infine, i segni e sintomi comuni sono quelli presenti sia nella GVHD acuta sia nella cronica e quindi da soli non permettono di distinguere le due forme.

Questa classificazione permette di definire la cGVHD in modo più accurato, migliorando la gestione clinica e il follow-up dei pazienti post-trapianto (Filipovich et al., 2005).

3.2 *Infezioni post trapianto*

Come citato in precedenza è stato verificato che le infezioni sono la causa più comune e significativa di mortalità e morbilità dopo il HSCT. Il processo di trapianto e la terapia immunosoppressiva aggiuntiva impiegata nel trattamento della GVHD possono aggravare e prolungare le preesistenti carenze delle funzioni immunitarie, sia umorali sia cellulari. Nei pazienti adulti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (allo-HSCT), la completa ricostituzione immunitaria richiede generalmente un periodo di almeno due o tre anni.

Nel periodo successivo al trapianto HSCT, il rischio infettivo viene comunemente suddiviso in tre fasi distinte:

1. Fase precoce di pre-attecchimento, che si estende dalle prime 2 alle 4 settimane successive all'infusione delle cellule staminali;
2. Fase precoce post-attecchimento, che comprende i primi 2–3 mesi dopo il trapianto;
3. Fase tardiva, che si colloca oltre il terzo mese all'attecchimento (Sahin et al., 2016).

Nella fase precoce di pre-attecchimento, i principali fattori di rischio infettivo sono rappresentati dalla neutropenia e dal danno della barriera mucosale. La durata della neutropenia varia generalmente da 5–7 giorni nei regimi di condizionamento a intensità ridotta fino a 15–30 giorni nei regimi mieloablativi. In questa fase, il quadro clinico infettivo è sovrapponibile a quello delle neutropenie febbrili post-chemioterapia: i batteri costituiscono i patogeni predominanti, mentre infezioni fungine (come *Candida* spp.) e virali (in particolare herpes simplex virus, HSV) risultano meno frequenti. Le manifestazioni cliniche più comuni includono batteriemia/sepsi, polmonite, infezioni del cavo orale, sinusiti, proctiti e infezioni dei tessuti molli (Sahin et al., 2016).

Nella fase precoce post-attecchimento, il rischio infettivo è fortemente influenzato dalla presenza di GVHD e dall'uso di terapia immunosoppressiva, oltre che dalle infezioni correlate a dispositivi come il catetere venoso centrale. In questo periodo si osserva un aumento delle infezioni da batteri enterici, che possono evolvere in quadri severi, soprattutto nei pazienti con interessamento gastrointestinale da GVHD. Sono inoltre frequenti infezioni opportunistiche sostenute da virus (adenovirus, virus BK, virus respiratori e citomegalovirus), funghi (*Candida* spp. *Aspergillus* spp.) e *Pneumocystis jirovecii*. L'infezione sintomatica da HCMV si manifesta tipicamente con polmonite o enterocolite, con potenziale esito fatale nei pazienti a rischio (Sahin et al., 2016).

Nella fase tardiva, caratterizzata da una graduale ricostituzione dell'immunità cellulare e umorale, il rischio infettivo rimane significativo, soprattutto nei pazienti con cGVHD e in trattamento immunosoppressivo prolungato. Oltre ai patogeni già osservati nelle fasi precedenti, si evidenziano infezioni da virus varicella-zoster (VZV) e da batteri capsulati. In questa fase sono inoltre rilevanti le riattivazioni di infezioni latenti, come *Toxoplasma gondii*, e la polmonite da *Pneumocystis jirovecii*, soprattutto in caso di sospensione precoce della profilassi. Al termine della terapia immunosoppressiva, è raccomandata l'introduzione di un adeguato programma vaccinale per il ripristino della protezione immunitaria (Sahin et al., 2016).

3.3 *Infezioni batteriche nel trapianto di cellule staminali ematopoietiche*

Le infezioni batteriche rappresentano una delle principali complicanze nei pazienti sottoposti a HSCT, contribuendo in modo significativo a morbilità e mortalità. Le manifestazioni cliniche più frequenti comprendono le infezioni del flusso sanguigno (bloodstream infections, BSI), la polmonite e le infezioni gastrointestinali, tra cui la tifi e le infezioni da *Clostridioides difficile*. Le infezioni del tratto urinario risultano invece meno comuni e sono generalmente associate alla presenza di catetere urinario. Storicamente, i batteri Gram-negativi rappresentavano la principale causa di mortalità infettiva durante la fase di neutropenia. Tuttavia, l'introduzione di strategie preventive e terapeutiche efficaci, come la somministrazione precoce di terapia antibiotica empirica in caso di febbre neutropenica e, in alcuni contesti, la profilassi antibiotica, ha determinato una significativa riduzione della mortalità. Nonostante questi progressi, negli ultimi anni si è osservato un aumento rilevante della diffusione di batteri multiresistenti agli antibiotici (MDR), in particolare Gram-negativi, che rappresentano una crescente minaccia clinica. Tra i principali patogeni coinvolti si

annoverano stafilococchi meticillino-resistenti (MRSA), enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE), Enterobacteriaceae produttrici di beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) e ceppi produttori di carbapenemasi, come *Klebsiella pneumoniae*, oltre a *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente agli antibiotici. La diffusione di questi microrganismi limita l'efficacia delle terapie empiriche standard e richiede un approccio sempre più mirato alla gestione antimicrobica.

Dal punto di vista epidemiologico, le infezioni del flusso sanguigno rappresentano la forma più frequentemente documentata, con un'incidenza pari a circa il 5–10% nei pazienti sottoposti a trapianto autologo e fino al 20–30% nei trapianti allogenici. Il rischio di BSI è massimo durante la fase di neutropenia pre-attecchimento ed è strettamente correlato alla presenza di mucosite e all'utilizzo del catetere venoso centrale. Nelle fasi successive, il rischio rimane elevato soprattutto nei pazienti con GVHD, ipogammaglobulinemia o dispositivi vascolari a permanenza (Balletto and Mikulska, 2015).

In questo contesto, risultano più frequenti le infezioni da batteri capsulati, come *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis*, rendendo fondamentale l'adozione di strategie preventive, tra cui la vaccinazione e, in specifici casi, la profilassi antibiotica (Sahin et al., 2016). Nel complesso, la gestione delle infezioni batteriche nel contesto dell'HSCT richiede un attento equilibrio tra strategie di prevenzione, diagnosi precoce e adeguata terapia antibiotica, tenendo conto della crescente diffusione di patogeni multiresistenti agli antibiotici (Ballato and Mikulska, 2015).

3.4 Infezioni fungine post-trapianto di cellule staminali ematopoietiche

Le infezioni fungine invasive (IFI) rappresentano una delle principali complicanze nei pazienti sottoposti a HSCT, contribuendo in modo significativo a morbilità e mortalità. I principali fattori di rischio includono il tipo di trapianto, il regime di condizionamento, la presenza di GVHD e la durata della neutropenia. Tra gli agenti responsabili, *Aspergillus* e *Candida* rimangono i più frequenti, mentre altre muffe e funghi più rari, come gli zigomiceti, hanno un'incidenza minore. Infezioni da *Pneumocystis*, funghi endemici o *Cryptococcus* sono invece rare.

Negli ultimi anni, i progressi nella diagnostica molecolare hanno consentito una più rapida identificazione delle IFI rispetto ai metodi tradizionali. La profilassi antifungina primaria si è dimostrata efficace nel ridurre l'incidenza di infezioni, anche se i tassi di recidiva restano

rilevanti. Dal punto di vista terapeutico, l'approccio è passato dall'uso tradizionale dell'amfotericina B a farmaci più mirati e meglio tollerati, quali itraconazolo, voriconazolo ed echinocandine, migliorando gli esiti clinici e riducendo gli effetti collaterali (Singh Rahi et al., 2021).

3.5 *Infezioni virali post trapianto*

Le infezioni virali rappresentano una delle principali cause di morbilità e mortalità nei pazienti sottoposti a HSCT, con un'incidenza che segue una precisa sequenza temporale. *Adenovirus*, *virus dell'influenza* e *virus respiratorio sinciziale* (RSV) possono manifestarsi in tutte le fasi post-trapianto, comprese quelle pre-attecchimento, post-attecchimento precoce e tardiva. Al contrario, le infezioni da *herpes simplex virus* (HSV) tipo 1 e 2 si osservano prevalentemente durante la fase pre-attecchimento. *Citomegalovirus* e *human herpesvirus 6* (HHV-6) sono più frequenti nella fase post-attecchimento precoce, cioè nei primi tre mesi dopo il trapianto, mentre *Epstein-Barr virus* (EBV) e *virus varicella-zoster* (VZV) tendono a riattivarsi nella fase tardiva, oltre il centesimo giorno post-trapianto (Sahin et al., 2016).

3.6 *HCMV nei pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche*

Nonostante i significativi progressi nei metodi molecolari per il rilevamento del HCMV e l'introduzione di strategie preventive sempre più efficaci, il HCMV rappresenta ancora oggi una delle principali cause di morbilità e mortalità nei pazienti HSCT. L'infezione può evolvere in malattie invasive d'organo, tra cui polmonite, epatite, colite, retinite ed encefalite, con tassi di mortalità che nei casi più gravi possono raggiungere il 60%. Oltre al danno diretto d'organo, l'infezione da HCMV è associata a un aumentato rischio di infezioni opportunistiche batteriche e fungine, allo sviluppo o al peggioramento della malattia del trapianto contro l'ospite (graft-versus-host disease, GVHD) e a un incremento della mortalità non correlata a recidiva della malattia di base. Il rischio di infezione da HCMV nei pazienti sottoposti a HSCT è fortemente influenzato dallo stato sierologico del donatore (D) e del ricevente (R). In particolare, il rischio di riattivazione o infezione primaria segue generalmente il seguente ordine: D-/R+ > D+/R+ > D+/R- > D-/R-, evidenziando come i pazienti sieropositivi rappresentino la popolazione maggiormente esposta alla riattivazione

virale. Tra i principali fattori predisponenti all'infezione nei riceventi di HSCT si annoverano l'utilizzo di corticosteroidi ad alte dosi, la deplezione delle cellule T, la presenza di GVHD e l'impiego di donatori non completamente compatibili o non consanguinei. Tuttavia, non tutti i soggetti sieropositivi esposti a tali fattori di rischio sviluppano una riattivazione clinicamente significativa del virus. Questo suggerisce che fattori legati all'ospite, in particolare quelli che regolano la risposta immunitaria mediata dalle cellule T specifiche per il HCMV, svolgano un ruolo determinante nella suscettibilità alla riattivazione virale. In questo contesto, un'elevata attenzione è rivolta allo studio dei meccanismi immunologici che modulano la riattivazione del HCMV e al potenziale del monitoraggio immunitario per identificare correlati della patogenesi e supportare le decisioni cliniche nella gestione dei pazienti sottoposti a HSCT (Camargo and Komanduri, 2017). L'infezione è causata dalla riattivazione del virus latente, o in modo meno frequente può essere causata dall'infezione primaria contratta a causa delle cellule staminali trapiantate.

4 TERAPIE ANTI-HCMV: Farmaci antivirali utilizzati per la gestione dell'infezione da HCMV

4.1 Trattamento dell'infezione

Nel trattamento dell'infezione da HCMV vengono utilizzati 4 farmaci: il *Ganciclovir* (GCV) e il *Valganciclovir* (VGCV) sono utilizzati come agenti antivirali di prima linea, sia nella profilassi che nel trattamento, il *Foscarnet* (FOS) e il *Cidofovir* (CDV) sono utilizzati maggiormente come farmaci di seconda linea (Gerna et al., 2019). Questi farmaci sono accumulati dall'aver come target la DNA polimerasi virale (UL54) (Figura 6). A differenza dei 4 agenti antivirali sopracitati, il *Letermovir* (LTV), un farmaco approvato per la prima volta nel 2017, ha come target il complesso della terminasi virale. La terapia preventiva dell'infezione da HCMV nei pazienti trapiantati viene effettuata principalmente per via endovenosa mediante ganciclovir sodico (ivGCV) o, in alternativa, FOS. Questa strategia richiede ospedalizzazione, comporta costi elevati e aumenta la morbilità a causa di complicanze correlate al catetere (Liu et al., 2010).

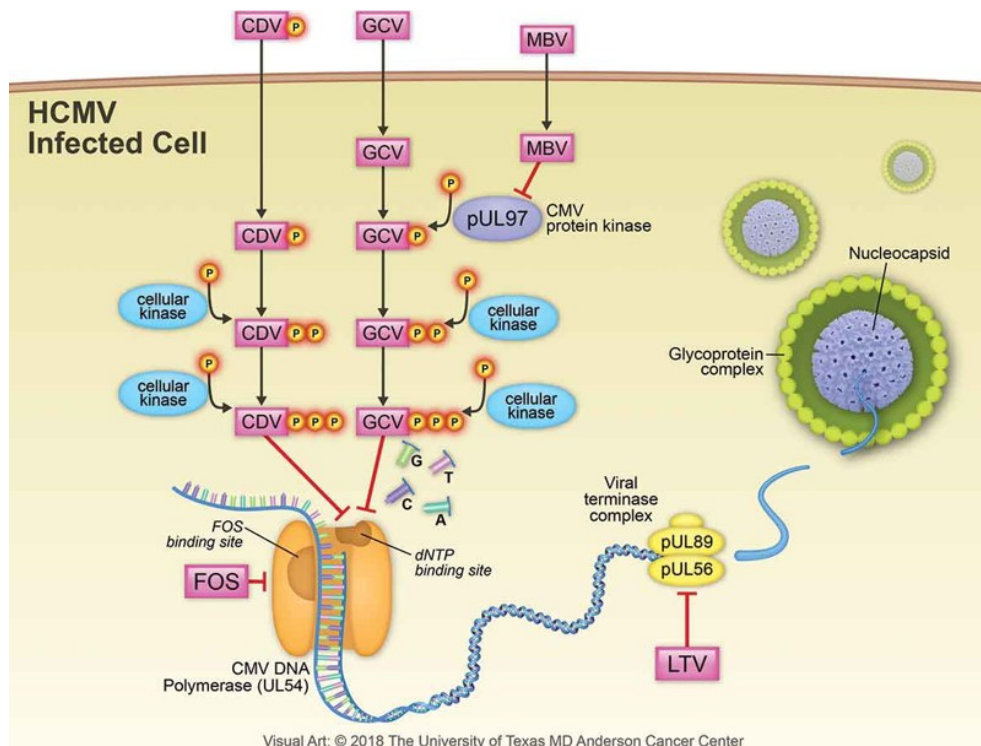


Figura 6. Meccanismo d'azione di GCV, FOS, CDV, LTV. Fonte: (Foolad, Aitken and Chemaly, 2018).

4.2 Ganciclovir e Valganciclovir

GCV fu il primo farmaco approvato per il trattamento dell'infezione da HCMV. È un analogo aciclico della deossiguanosina, strutturalmente simile all'aciclovir, ma con attività antivirale superiore contro il HCMV. La concentrazione necessaria per inibire il 50% della replicazione virale (EC50) è di circa 2,15 μmol , rispetto ai 72 μmol richiesti dall'aciclovir. Dal punto di vista farmacocinetico, GCV presenta un decadimento biesponenziale con emivita terminale di circa 2,5 ore, un'ampia distribuzione tissutale, capacità di penetrazione nel liquido cerebrospinale e dipendenza renale per l'eliminazione. I dosaggi comunemente impiegati per il trattamento delle infezioni da HCMV variano tra 3 e 15 mg/kg/die, in base alla gravità della malattia e alle condizioni del paziente. Pazienti immunocompromessi non sottoposti a trapianto, come quelli affetti da AIDS, sembrano mostrare una risposta più favorevole, attorno al 70%, rispetto ai riceventi di HSCT. Le recidive della malattia sono frequenti alla sospensione della terapia, rendendo talvolta necessaria una terapia di mantenimento per consolidare il beneficio clinico. Tra le principali reazioni avverse, la neutropenia rappresenta il fattore limitante più importante per l'utilizzo del farmaco. Sebbene siano necessari ulteriori studi per definire i fattori di rischio per la neutropenia, le strategie di somministrazione

alternative e il rischio di sviluppo di ceppi resistenti, GCV rimane un farmaco di riferimento nel trattamento delle infezioni da HCMV nei pazienti ad alto rischio (Fletcher and Balfour, 1989). GCV è un analogo nucleosidico che viene inizialmente monofosforilato dalla chinasi virale UL97; successivamente, subisce ulteriori fosforilazioni ad opera di chinasi cellulari fino a raggiungere la forma attiva trifosfato. Quest'ultima inibisce competitivamente la DNA polimerasi dell'HCMV (UL54), interferendo con la sintesi del DNA virale (Gentry et al., 2011).

A causa della sua bassa biodisponibilità orale, il farmaco viene somministrato prevalentemente per via endovenosa, mentre la formulazione orale è oggi largamente sostituita dal VGCV, un profarmaco con migliore assorbimento (Liu et al., 2010). VGCV è un profarmaco orale di GCV, progettato per superare la scarsa biodisponibilità della somministrazione orale del farmaco originale. Dopo assorbimento intestinale, VGCV viene rapidamente idrolizzato a GCV attivo. Il farmaco è indicato nella profilassi e nella terapia pre-emptive dell'infezione da HCMV in pazienti sottoposti a trapianto ematopoietico o renale, e può essere utilizzato in ambito ambulatoriale grazie alla sua elevata biodisponibilità orale del 60%, che permette di ottenere concentrazioni plasmatiche comparabili alla somministrazione endovenosa di GCV (Perrottet et al., 2009). I principali vantaggi includono la possibilità di evitare ospedalizzazioni e complicanze legate ai cateteri EV, mentre i limiti riguardano principalmente la mielotossicità, in particolare neutropenia e trombocitopenia, e la necessità di aggiustamento della dose in caso di insufficienza renale (Gerna et al., 2019). Numerosi studi clinici hanno confermato l'efficacia del VGCV nella clearance della viremia da HCMV, con tassi di successo fino all'89–91%, e un profilo di sicurezza complessivamente sovrapponibile alla terapia endovenosa. Una problematica legata all'utilizzo di questi due farmaci è l'induzione di farmaco-resistenza, legata in particolar modo a mutazioni nell'ORF di UL97, che alterano il processo di fosforilazione del GCV (Baldanti et al., 1998, Baldanti et al., 1995).

4.3 *Foscarnet*

FOS è un analogo inorganico del pirofosfato dell'acido fosfonoacetico che inibisce tutti gli herpesvirus umani (HHV), inclusi gli isolati di HCMV resistenti al GCV e i ceppi di HSV e VZV resistenti all'aciclovir. Agisce direttamente sulla DNA polimerasi virale bloccando il sito di legame del pirofosfato e impedendo la scissione dei deossinucleotidi trifosfati, senza richiedere attivazione da chinasi virus-specifica. Pertanto, i virus privi di tirosina chinasi

rimangono sensibili al farmaco. FOS presenta una biodisponibilità orale di circa il 20% e una concentrazione nel liquido cerebrospinale pari a circa due terzi di quella plasmatica. L'eliminazione avviene principalmente per via renale, con oltre l'80% della dose escreta tramite urine, mentre il sequestro osseo determina una complessa farmacocinetica (Paintsil and Cheng, 2009). La resistenza a FOS è rara e riguarda mutazioni della DNA polimerasi virale. Gli effetti avversi più rilevanti includono nefrotossicità (necrosi tubulare acuta e nefrite interstiziale), squilibri elettrolitici (ipomagnesiemia, ipocalcemia, ipokaliemia, ipofosfatemia) e tossicità neurologica (cefalea, convulsioni, irritabilità, tremori e allucinazioni). Altri eventi avversi riportati comprendono febbre, eruzioni cutanee, ulcere genitali, diarrea, nausea e vomito (Paintsil and Cheng, 2009).

4.4 Cidofovir

CDV è un analogo nucleotidico fosfonato aciclico del deossicitidina monofosfato. A differenza di altri antivirali come l'aciclovir, CDV possiede già un gruppo fosfato, pertanto non richiede enzimi virali per essere attivato. Le chinasi cellulari convertono il monofosfato in trifosfato attivo, che agisce come inibitore competitivo della DNA polimerasi virale. Questo metabolita attivo mostra un'affinità 25-50 volte maggiore per la DNA polimerasi virale rispetto a quella cellulare, garantendo un'inibizione selettiva della replicazione virale. CDV mantiene attività contro isolati di HSV resistenti ad aciclovir e foscarnet, così come contro mutanti di HCMV resistenti a GCV e FOS. Nonostante la potenza *in vitro* sia inferiore rispetto all'aciclovir, il cidofovir persiste a lungo all'interno delle cellule e produce metaboliti con emivita di 17-48 ore, consentendo una somministrazione settimanale. È un farmaco che si concentra principalmente nelle cellule renali, con conseguente rischio di grave nefrotossicità a livello del tubulo contorto prossimale, e presenta una biodisponibilità orale molto limitata (2-26%), pertanto viene somministrato per via endovenosa. Lo sviluppo di resistenza è raro, ma mutazioni della DNA polimerasi del HCMV possono ridurre la suscettibilità al farmaco. Tra gli effetti avversi come citato in precedenza la nefrotossicità è l'evento avverso principale, osservato nel 30-50% dei pazienti. Altri effetti riportati comprendono neutropenia, febbre, diarrea, nausea, cefalea, eruzioni cutanee, uveite anteriore e ipotonia (Paintsil and Cheng, 2009). Il CDV può inoltre causare una cross-resistenza al GCV (Lurain and Chou, 2010).

4.5 *Letermovir*

A causa della tossicità e dei fenomeni di farmaco-resistenza, il bisogno di nuovi farmaci con profili di sicurezza migliori ed efficaci anche in contesti di resistenza è aumentato, portando allo studio di nuove molecole da poter utilizzare per il controllo dell'infezione. Tra le varie classi di farmaci disponibili, una grande attenzione è stata rivolta verso gli *inibitori della terminasi*. Tra questi LTV è stato il primo farmaco ad essere approvato per la profilassi nei trapiantati di midollo, sia dalla FDA sia dall'EMA (Gerna et al., 2019). Con l'introduzione di LTV, la prevenzione dell'infezione da HCMV nei pazienti sottoposti a HSCT potrebbe subire un cambiamento significativo, passando da una strategia prevalentemente preventiva a una che sfrutta questa nuova terapia a scopo profilattico (Foolad et al., 2018). LTV è il primo inibitore della terminasi dell'HCMV approvato per uso clinico, rappresentando un approccio antivirale innovativo rispetto ai farmaci tradizionali che agiscono sulla DNA polimerasi (GCV, FOS, CDV). La sua azione è specifica per il citomegalovirus umano, senza attività rilevabile su altri virus. Durante la replicazione del virus, il DNA dell'HCMV, inizialmente lineare, circolarizza nel nucleo e si replica mediante un meccanismo di tipo *rolling circle*, formando lunghi concatameri. Per generare virus infettivi, questi concatameri devono essere scissi in singoli genomi di lunghezza unitaria e impacchettati nei capsidi preformati. Questo processo è mediato dal complesso della terminasi, un eterotrimerico costituito dalle subunità pUL56 (ATPasi), pUL89 (nucleasi) e pUL51, che riconosce i segnali di impacchettamento, scinde il DNA concatamerico e lo inserisce nei procapsidi. Il *Letermovir* interferisce con questo complesso, impedendo il taglio dei concatameri e l'impacchettamento del DNA virale. Di conseguenza, si accumula DNA immaturo all'interno della cellula infetta e la formazione di nuovi virioni infettivi viene bloccata. Studi *in vitro* hanno dimostrato che questo farmaco possiede una potenza antivirale significativamente superiore a quella del ganciclovir e, grazie all'assenza di omologhi della terminasi nelle cellule umane, il farmaco mostra un basso rischio di effetti off-target (Gentry et al., 2019).

5 SCOPO DEL LAVORO

L'infezione da HCMV rappresenta una delle principali complicanze nei pazienti sottoposti a HSCT, a causa della profonda immunosoppressione e della lenta ricostituzione dell'immunità cellulo-mediata post-trapianto. Nonostante l'introduzione della profilassi antivirale con letermovir abbia significativamente ridotto l'incidenza delle riattivazioni precoci, una quota rilevante di pazienti sviluppa riattivazioni tardive dopo la sospensione del trattamento, generalmente oltre il giorno +100, fase in cui il controllo dell'infezione virale dipende in maniera cruciale dal recupero dell'immunità T HCMV-specifica.

Sebbene il ruolo centrale dell'immunità cellulo-mediata nel controllo delle infezioni clinicamente significative da HCMV sia ampiamente riconosciuto, non è attualmente disponibile un test standardizzato, affidabile e facilmente applicabile nella pratica clinica per la sua valutazione nei pazienti trapiantati. Diverse metodiche immunologiche sono state sviluppate per la quantificazione *ex vivo* e la caratterizzazione funzionale delle risposte T antigene-specifiche, tra cui ELISA, ELISpot e citometria a flusso. Tuttavia, ciascuna di queste presenta limiti rilevanti.

I test ELISA ed ELISpot sono metodiche altamente sensibili e specifiche per la rilevazione della produzione di citochine, ma non consentono una caratterizzazione fenotipica delle cellule T attivate. Al contrario, la citometria a flusso permette un'analisi combinata della funzione e del fenotipo cellulare, ma è gravata da elevata complessità tecnica, costi significativi e scarsa standardizzazione. Inoltre, sia la citometria a flusso sia l'ELISpot richiedono l'isolamento delle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), una procedura tecnicamente impegnativa che necessita di personale altamente qualificato e di tempistiche rigorose, poiché i campioni devono essere processati o crioconservati entro poche ore dal prelievo per garantire l'affidabilità dei risultati. Questi aspetti ne limitano fortemente l'impiego nella routine clinica.

In questo contesto, i test basati su sangue intero rappresentano un approccio più semplice e potenzialmente più applicabile, in quanto richiedono un minor volume di sangue, tempi di esecuzione ridotti e un minore livello di manipolazione del campione. Attualmente, il QuantiFERON-CMV è l'unico test IGRA commerciale disponibile per la valutazione dell'immunità cellulo-mediata HCMV-specifica su sangue intero; tuttavia, esso presenta importanti limitazioni, tra cui la dipendenza dalla restrizione HLA di classe I e la conseguente

valutazione selettiva della risposta delle cellule T CD8+, senza fornire informazioni sulla componente CD4+, fondamentale nel controllo dell'infezione.

Evidenze recenti indicano che l'utilizzo di antigeni più complessi, come proteine ricombinanti o pool di peptidi sovrapposti, consente di stimolare in maniera più completa la risposta immunitaria, coinvolgendo sia le cellule T CD4+ che CD8+ e fornendo quindi una valutazione più rappresentativa dell'immunità HCMV-specifica.

Alla luce di queste considerazioni, il presente studio si propone di valutare e confrontare diverse metodiche immunologiche per la misurazione della risposta T HCMV-specifica, con particolare attenzione allo sviluppo e alla validazione di un test IGRA su sangue intero basato sulla stimolazione con antigeni pp65 (proteina ricombinante e pool di peptidi sovrapposti), con l'obiettivo di ottenere un metodo semplice, riproducibile, sensibile e specifico, applicabile nella pratica clinica.

La risposta immunitaria è stata valutata al giorno +100 post-trapianto mediante diversi approcci (pp65-IGRA, QuantiFERON-CMV, ELISpot e citometria a flusso con colorazione intracellulare delle citochine), e correlata con l'andamento della HCMV-DNAemia e con la necessità di terapia antivirale pre-emptive. I pazienti sono stati stratificati in "controllers" e "non-controllers" sulla base del controllo virologico dopo sospensione della profilassi.

L'obiettivo finale è identificare un parametro immunologico affidabile per la stratificazione del rischio di riattivazione tardiva da HCMV e per guidare strategie di gestione personalizzata, incluso il potenziale prolungamento della profilassi antivirale nei pazienti ad alto rischio.

6 MATERIALI E METODI

6.1 Pazienti arruolati e follow-up

Durante il periodo tra il marzo 2023 e il marzo 2025 sono stati arruolati 48 pazienti sieropositivi per HCMV, sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche presso la Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia. Da ciascuno di questi pazienti è stato prelevato un campione di sangue intero eparinizzato, rispettivamente a 100 giorni dal trapianto, al termine della profilassi universale con Letemovir, e a 180 giorni post-trapianto.

I pazienti in studio hanno ricevuto LTV 240 mg per via orale una volta al giorno, iniziando entro 1 giorno dall'infusione delle cellule staminali e proseguendo fino al giorno 100. Dopo il trapianto, per i primi 100 giorni, la HCMV-DNAemia è stata quantificata due volte a settimana mediante RT-PCR, fino al giorno 100. Successivamente ai primi 3 mesi, i pazienti sono stati monitorati in occasione delle visite mediche programmate o in presenza di sintomi clinici correlati a HCMV. Dopo la sospensione della profilassi con LTV, la terapia pre-emptive con VGCV orale (900 mg due volte al giorno), o con GCV endovena (5 mg/kg/die) per i pazienti ospedalizzati, è stata iniziata ogniqualvolta la DNAemia di HCMV raggiungeva o superava il valore di 10.000 copie di DNA/ml di sangue intero. I pazienti che hanno presentato livelli HCMV-DNAemia non rilevabile o trascurabili dopo la sospensione di LTV sono stati definiti «Controllers» (CTR), mentre i pazienti che hanno sviluppato un'infezione da HCMV clinicamente significativa, che hanno dunque necessitato di una terapia anti-virale dopo la fine della profilassi con LTV, sono stati definiti «Non-controllers» (N-CTR). Tutti i soggetti hanno firmato il consenso informato. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico locale (Comitato Etico Area Pavia) e dall'Institutional Review Board (Proc. 2022-3.11/451)

6.2 Isolamento cellule mononucleate da sangue periferico

Le cellule periferiche mononucleate da sangue periferico (PBMC) sono state isolate tramite separazione su gradiente di densità. Brevemente, il campione di sangue intero è stato stratificato sul medium di separazione *Ficoll-Paque PLUS medium*TM (Gibco, $d=1.0770$) in provette sterili da 50mL provviste di setto poroso di separazione (Figura 7A) e centrifugato a 2200 rpm per 20 minuti a temperatura ambiente (FIGURA 7B). Questo consente la separazione delle diverse componenti del sangue in base alla densità: eritrociti e granulociti polimorfonucleati si stratificano sul fondo della provetta, seguiti da uno strato di medium di separazione. Al di sopra del setto poroso, all'interfaccia tra *Lymphoprep*TM e plasma, si ha la stratificazione delle cellule di nostro interesse (Figura 7C).

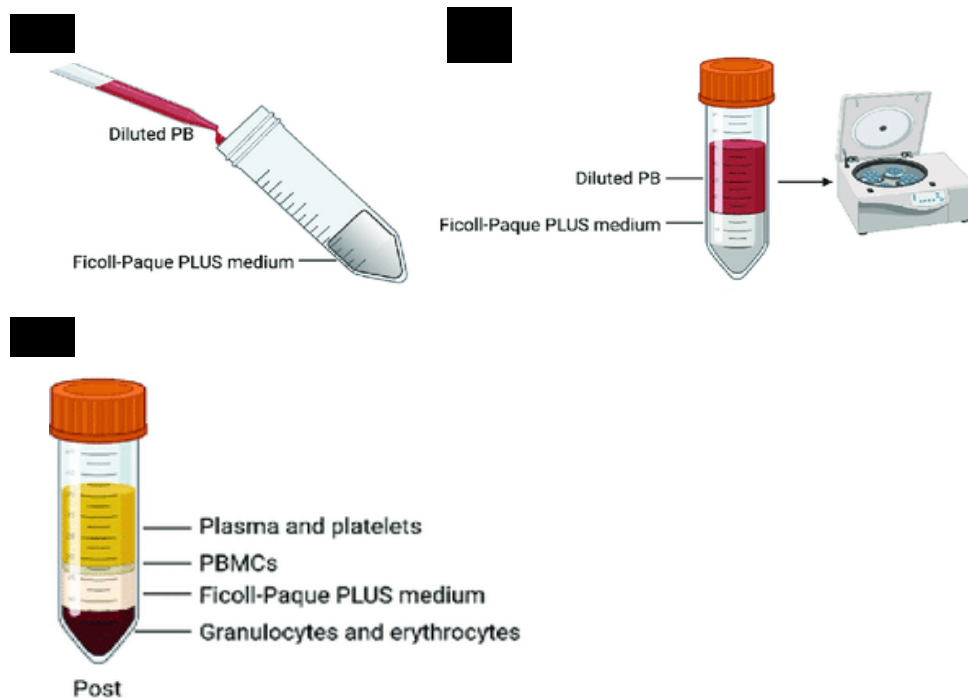


Figura 7. Isolamento dei PBMC tramite gradiente di densità.

Queste vengono raccolte, risospese in tampone fosfato bilanciato (PBS) e centrifugate a 1800 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente per eliminare residui di plasma e medium di separazione. Il surnatante viene quindi eliminato; rimane un *pellet* di sedimento compatto sul fondo della provetta costituito da cellule adese. Successivamente le cellule sono state contate tramite microscopio ottico in camera di *Burker* con utilizzo di *Trypan Blue*, intercalante del DNA che evidenzia le cellule morte penetrando nella membrana delle stesse quando danneggiata.

Le cellule così separate sono state utilizzate per i saggi funzionali; sono conservate fino al momento dell'utilizzo in nitrogeno liquido, o, se da analizzare entro poche ore, risospese in medium di coltura RPMI (RPMI 1640; 1% penicillina-streptomina, 1% glutammina, 10% *fetal bovine serum* (FBS) inattivato al calore) e conservate fino all'utilizzo in incubatore a 37°C, 5% CO₂.

6.2.1 Monitoraggio HCMV DNA su sangue intero

Il monitoraggio dell'infezione da HCMV nei pazienti sottoposti a trapianto è stato effettuato mediante quantificazione della DNAemia virale su sangue intero (whole blood), utilizzando tecniche di biologia molecolare basate su amplificazione genica quantitativa (real-time PCR, qPCR), in accordo con le linee guida internazionali.

Per ciascun paziente sono stati eseguiti prelievi seriali di sangue periferico in provette contenenti EDTA. I campioni sono stati processati secondo le procedure del laboratorio, con estrazione del DNA virale da aliquote di sangue intero mediante kit commerciali basati su tecnologia a colonna o su particelle magnetiche, secondo le istruzioni del produttore. Il DNA estratto è stato successivamente eluito e conservato a -20°C fino al momento dell'analisi. La quantificazione del genoma virale è stata effettuata mediante amplificazione di una regione conservata del gene UL83 (pp65) di HCMV. La rilevazione del prodotto di amplificazione è stata eseguita mediante sonda TaqMan a fluorescenza (FAM/TAMRA). Ogni reazione è stata condotta in presenza di controlli negativi, positivi e di controllo interno di estrazione, al fine di garantire l'affidabilità del dato analitico.

La quantificazione della DNAemia è stata ottenuta mediante curva standard generata da diluizioni seriali di standard virale e i risultati sono stati espressi come copie di HCMV DNA per millilitro di sangue intero, secondo lo standard dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO). Il monitoraggio è stato eseguito con frequenza bisettimanale fino al giorno +100 post-trapianto e successivamente durante il follow-up clinico, in base allo stato

immunologico e clinico del paziente. Per l'interpretazione clinica sono stati utilizzati cut-off di riferimento validati in letteratura: valori inferiori a 1.000 copie/mL sono stati considerati di bassa rilevanza clinica, mentre valori superiori a 10.000 copie/mL sono stati utilizzati come soglia per l'avvio della terapia antivirale pre-emptive.

6.2.2 Isolamento e crioconservazione delle cellule mononucleate di sangue periferico

Per ciascun paziente è stato effettuato un prelievo di sangue periferico in provette contenenti litio-eparina. I campioni sono stati processati entro poche ore dal prelievo per l'isolamento delle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC). L'isolamento è stato eseguito mediante centrifugazione su gradiente di densità utilizzando Ficoll-Paque™ (Cytiva, Uppsala, Svezia). Il sangue è stato trasferito in provette da 50 mL contenenti separatore e centrifugato a 2200 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente. Al termine della centrifugazione, lo strato contenente plasma e PBMC è stato recuperato e trasferito in una nuova provetta, quindi diluito con soluzione salina tamponata (PBS) fino a volume. Le cellule sono state successivamente sottoposte a centrifugazione a 1800 rpm per 5 minuti e il surnatante è stato eliminato. In presenza di contaminazione eritrocitaria, il pellet cellulare è stato trattato con tampone di lisi eritrocitaria (ACK lysing buffer, Gibco™) per 5 minuti a temperatura ambiente, seguito da lavaggio con PBS e centrifugazione a 1800 rpm per 5 minuti. Al termine dei lavaggi, le cellule sono state risospese in PBS o terreno di coltura e sottoposte a conta cellulare mediante sistema automatizzato. I PBMC sono stati opportunamente criopreservati in freezing medium costituito da 90% siero fetale bovino (FBS) e 10% dimetilsolfossido (DMSO) e conservate in azoto liquido fino all'utilizzo.

6.3 Determinazione della risposta immune nei confronti di HCMV

Nei pazienti arruolati nello studio, la valutazione della risposta T HCMV-specifica è stata effettuata mediante saggi funzionali di tipo IGRA (Interferon-Gamma Release Assay), basati sulla misurazione dell'IFN- γ prodotto in seguito a stimolazione antigenica specifica. In questo studio sono stati utilizzati tre approcci complementari: un saggio ELISPOT commerciale, T-SPOT.CMV (Oxford Immunotec Ltd. Regno Unito), eseguito su PBMC; il test QuantiFERON-CMV (Qiagen, Germania), eseguito su sangue intero; un saggio IGRA "home-made" basato su stimolazione con antigeni pp65, eseguito su sangue intero.

L'utilizzo combinato di queste metodiche ha permesso di valutare sia la frequenza di cellule T secernenti IFN- γ a livello singolo-cellulare, sia la produzione complessiva di citochina nel compartimento ematico.

La stimolazione antigenica è stata effettuata utilizzando antigeni derivati dalle principali proteine immunodominanti di HCMV, in particolare IE1 (Immediate Early 1) e pp65 (UL83). IE1 è una proteina espressa nelle fasi precoci dell'infezione virale, coinvolta nell'avvio del ciclo replicativo, mentre pp65 è una fosfoproteina strutturale di 65 kDa altamente immunogenica, abbondantemente espressa nelle fasi tardive dell'infezione e rappresentante il principale target della risposta T antivirale.

6.4 *T.Spot.CMV*

Per questo studio è stato utilizzato un saggio ELISPOT commerciale: T-SPOT.CMV (Oxford Immunotec Ltd. Regno Unito), per la valutazione della risposta immunitaria T HCMV-specifica (Figura 8).

La procedura è stata eseguita in condizioni di sterilità in una cabina a flusso laminare/classe II. Dapprima le PBMC sono state opportunamente scongelate e successivamente risospese in RPMI 1640 supplementato con 1% di Penicillina e Streptomina, 1% di Glutamina, 10% di Fetal Bovine Serum. Al termine di una incubazione overnight per 12-18 ore in un incubatore umidificato a 37°C con CO₂ al 5% le cellule sono state contate e risospese alla concentrazione di 2×10^6 /mL in terreno di coltura AIM V (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) un terreno privo di siero ottimizzato per la coltura di cellule immunitarie. Il T-SPOT®.CMV per lo studio della risposta cellulo-mediata specifica per HCMV impiega pool di peptidi progettati per coprire l'intera sequenza delle proteine pp65 e IE1 stimolando indistintamente la risposta T cellulare sia CD4+ che CD8+.

Per ciascun campione sono stati allestiti quattro pozzetti: un controllo negativo (medium privo di stimolo antigenico), due pozzetti contenenti antigeni specifici per HCMV un pool di peptidi sovrapposti (overlapping peptides) pp65 (phosphoprotein 65 kDa) e IE-1 (Immediate Early-1). Ciascun pool è costituito da peptidi sintetici di 15 aminoacidi con una sovrapposizione di 11 aminoacidi (15-mer overlapping by 11 aa), progettati per garantire la copertura completa delle regioni antigeniche immunogeniche delle due proteine virali. Questa strategia consente la presentazione efficiente degli epitopi sia tramite MHC classe I che classe II, permettendo la rilevazione della risposta T HCMV-specifica mediante

produzione di IFN- γ ., un controllo positivo rappresentato dalla fitoemoagglutinina (PHA), utilizzata per valutare la capacità funzionale globale dei linfociti T.

In ciascun pozzetto sono stati inseriti circa 2×10^5 cellule, seguiti dall'aggiunta degli stimoli antigenici secondo le indicazioni del produttore. La piastra è stata incubata a 37°C in atmosfera umidificata con 5% CO₂ per 16–20 ore. Al termine dell'incubazione, la piastra è stata opportunamente lavata per rimuovere le cellule in eccesso e vengono incubate con un anticorpo di rivelazione anti-IFN- γ coniugato secondo il protocollo del kit. Dopo successivi lavaggi, è stato aggiunto il substrato cromogenico, con sviluppo di spot visibili corrispondenti alle cellule secernenti IFN- γ . La reazione è stata arrestata mediante lavaggio con acqua distillata e la piastra è stata lasciata asciugare completamente. Gli spot sono stati contati mediante sistema automatizzato ELISPOT (Autoimmun Diagnostika GmbH, Germania). I risultati sono stati espressi come unità formanti spot (Spot Forming Units, SFU) per 10⁶ PBMC, previa sottrazione del controllo negativo. I campioni con conta linfocitaria CD3 inferiore a 150 cellule/ μ L non sono stati considerati valutabili e sono stati assegnati valori arbitrari pari a 0,1 SFU/10⁶ PBMC.

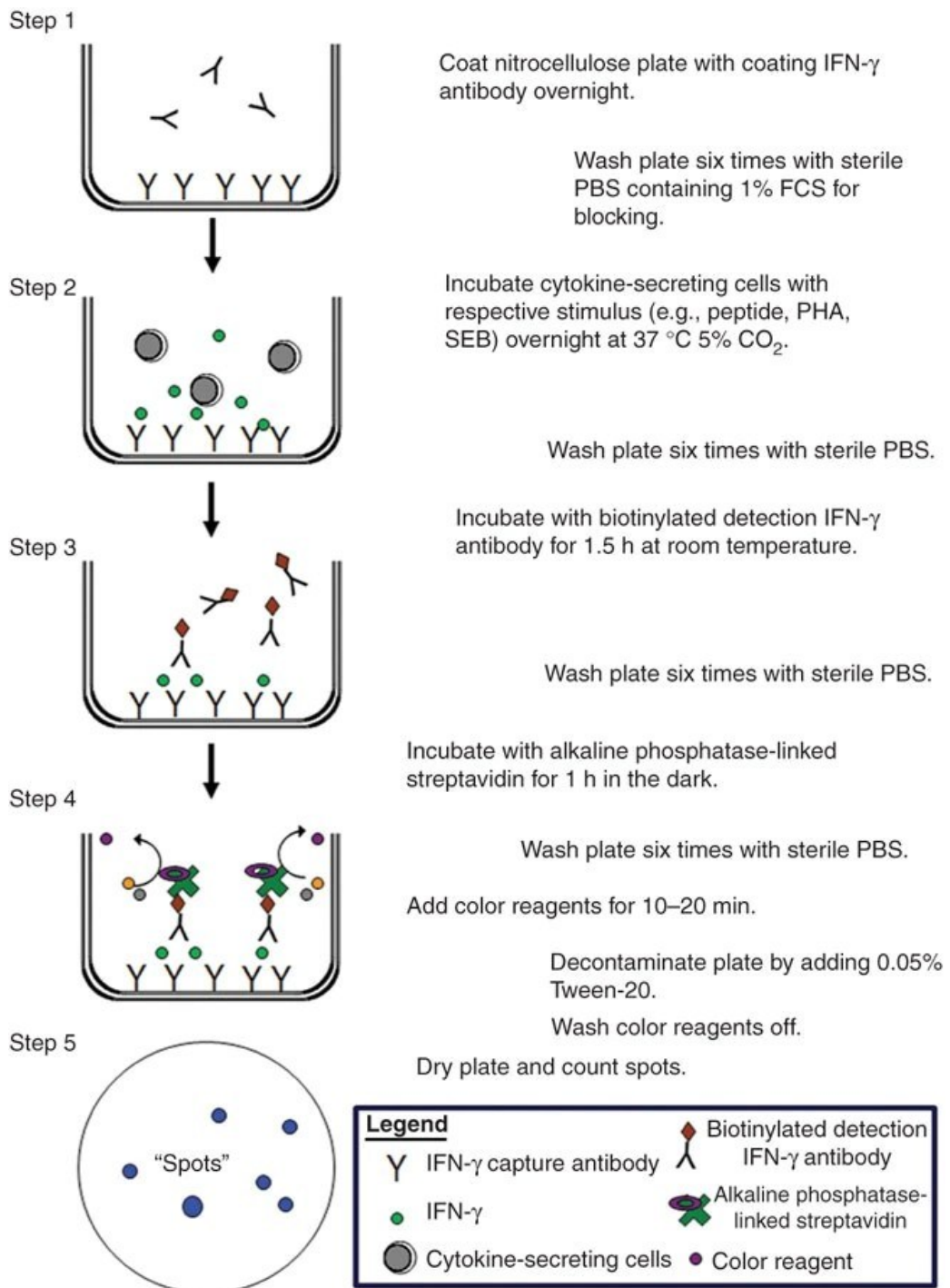


Figura 8. Rappresentazione schematica dei principi di un test ELISPOT.
 Fonte: (Streeck, Frahm and Walker 2009).

6.5 Valutazione della risposta T cellulare HCMV-specifica su sangue intero:

QUANTIferon CMV e pp65-IGRA

Il test QuantiFERON-CMV è stato eseguito su sangue intero eparinizzato secondo un protocollo modificato a partire dalle istruzioni del produttore (Qiagen, Germania). Il sistema si basa sulla stimolazione in vitro di sangue intero per la valutazione della produzione di IFN- γ da parte dei linfociti T HCMV-specifici.

Per ciascun campione, 1 mL di sangue periferico è stato distribuito in tubi di stimolazione contenenti differenti condizioni sperimentali: un controllo negativo (Nil) contenente solo terreno di coltura, viene utilizzato per determinare il livello di base di IFN- γ presente nel sangue del paziente. Un Controllo positivo mitogenico (Mitogeno) contenente fitoemoagglutinina (PHA), un mitogeno che stimola in modo aspecifico tutti i linfociti T serve a confermare che il sistema immunitario del paziente è in grado di produrre IFN- γ . Lo stimolo antigenico specifico per HCMV fornito dal kit consiste in un pool di peptidi sovrapposti derivati dalle proteine immunodominanti virali pp65 e IE-1. Tale pool è costituito da peptidi 15-mer con sovrapposizione di 11 amminoacidi, progettati per garantire un'ampia copertura delle regioni antigeniche e la presentazione attraverso un ampio spettro di molecole HLA di classe I, rendendo il test sostanzialmente indipendente dalla tipizzazione HLA del paziente e permettendo l'attivazione prevalente dei linfociti T CD8⁺ HCMV-specifici. Lo stimolo antigenico specifico per HCMV fornito dal kit consiste in un pool di peptidi derivati da proteine immunodominanti del virus, progettati per attivare prevalentemente i linfociti T CD8⁺. Al fine di ampliare e rendere più completa la caratterizzazione della risposta T HCMV-specifica, è stato inoltre implementato un approccio IGRA su sangue intero basato sulla proteina pp65. In particolare, sono stati utilizzati due ulteriori sistemi di stimolazione antigenica: un pool di peptidi derivati dalla proteina pp65 (UL83), costituito da peptidi sintetici di 15 amminoacidi (15-mer) parzialmente sovrapposti (overlapping di 10–11 amminoacidi), in grado di coprire l'intera sequenza proteica e favorire la presentazione di un ampio repertorio di epitopi antigenici, con conseguente attivazione sia dei linfociti T CD4⁺ che CD8⁺; la proteina ricombinante pp65 (Abcam, Cambridge, Regno Unito), che richiede processamento antigenico da parte delle cellule presentanti l'antigene e consente una valutazione più selettiva della risposta dei linfociti T CD4⁺.

Gli antigeni aggiuntivi sono stati utilizzati alla concentrazione finale di 1 μ g/mL nel sistema di stimolazione. Dopo aver inoculato 1 mL di sangue periferico nelle analoghe provette

contenenti gli stimoli, le provette sono state incubate per 20–24 ore a 37°C in atmosfera controllata, in un incubatore umidificato con CO₂ al 5%, al termine delle quali il plasma è stato separato mediante centrifugazione e successivamente analizzato per la quantificazione IFN- γ mediante test immunoenzimatico ELISA (QuantiFERON-CMV ELISA), secondo le indicazioni del produttore (Qiagen, Germania). I risultati sono stati espressi in Unità Internazionali per millilitro (IU/mL) e calcolati mediante software dedicato di analisi. Il limite di quantificazione del saggio era pari a 100 IU/mL; valori inferiori a tale soglia sono stati considerati quantificabili ma con limitata precisione analitica.

6.6 *Analisi statistica*

Le variabili quantitative sono state riportate come mediana e intervallo interquartile (IQR), mentre le variabili qualitative sono state riportate come frequenze o numeri assoluti. Le variabili quantitative sono state confrontate utilizzando il test non parametrico di Mann-Whitney per dati non appaiati mentre il Wilcoxon signed-rank test è stato utilizzato per il confronto di dati appaiati. L'analisi delle curve ROC (receiver operating characteristic) è stata eseguita per valutare i cut-off ottimali in grado di discriminare i Controllers (CTR) dai Non-controllers (Non-CTR). I cut-off sono stati stabiliti in base all'indice di Youden (o statistica J di Youden) [cit] definito come:

$$J = \text{sensibilità} + \text{specificità} - 1$$

Tutte le analisi sono state effettuate utilizzando GraphPad Prism 9.1.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Tutti i test erano a due code e un valore di p.

7 RISULTATI

7.1 Caratteristiche della popolazione in studio

Sono stati analizzati 48 pazienti sieropositivi per HCMV sottoposti a HSCT tra questi 19/48 di essi (39.5%) hanno mostrato la presenza di HCMV DNA nel sangue, nell'intervallo di tempo tra i 100 e i 180 giorni dal trapianto, con un valore mediano di 4.993 copie/ml (range interquartile, IQR: 1371-20339). Di questi, 12/48 (25%, Non controllers, NCT) pazienti hanno raggiunto livelli soglia di HCMV DNA per l'inizio della terapia pre-emptive, con un valore mediano di HCMV DNA di 14529 copie/mL (IQR 4366-39965), mentre negli altri 7 casi l'HCMV DNA è scomparso spontaneamente dopo un tempo mediano di 1 giorno.

Questi 7 soggetti, che hanno mostrato livelli di DNAemia trascurabili e i 29 soggetti (n=36) che non hanno mai mostrato la presenza di HCMV DNA nel sangue sono stati definiti «Controllers» (CTR, n=36) (Figura 9).

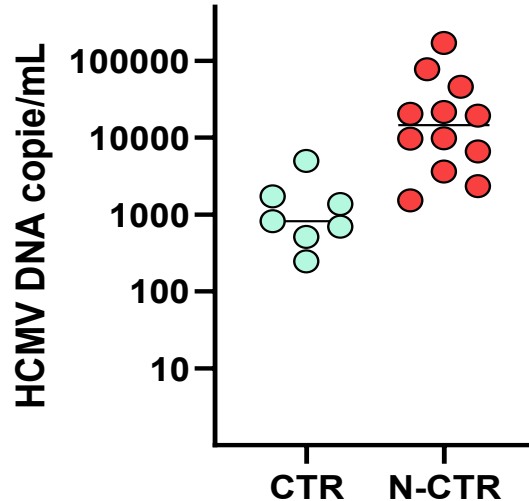


Figura 9. Distribuzione della carica virale (HCMV DNA) nei gruppi CTR e N-CTR. I livelli di DNAemia sono riportati in scala logaritmica (copie/mL). Il gruppo N-CTR mostra valori significativamente più elevati rispetto al gruppo CTR, con una mediana di 14.529 copie/mL.

Le caratteristiche demografiche risultavano sostanzialmente sovrapponibili tra i due gruppi, senza differenze rilevanti in termini di età media (58.5 vs 58.4 anni). In entrambi i gruppi si osservava una predominanza del sesso maschile, più marcata nei N-CTR (75% vs 58.3%). Analogamente, la distribuzione del sierostato donatore/ricevente non mostrava variazioni significative, con prevalenza della combinazione D+/R+ in entrambi i gruppi.

Per quanto riguarda la patologia di base, la leucemia mieloide acuta (AML) rappresentava la condizione più frequente in entrambe le coorti (41.7% nei Controllers e 50% nei Non-controllers), mentre le altre patologie risultavano distribuite in maniera eterogenea e con bassa numerosità. Come atteso per definizione, tutti i pazienti N-CTR hanno richiesto terapia antivirale pre-emptive dopo la sospensione della profilassi, prevalentemente con valganciclovir (66.7%), seguito da ganciclovir (25%) e foscarnet (8.3%) (Tabella 2).

Tabella 2. Caratteristiche della popolazione analizzata nello studio.

	CTR	NON-CTR
	N (%)	N (%)
SESSO		
UOMINI	21	9
DONNE	15	3
ETÀ MEDIA	58.5 (21-75)	58.42 (35-75)
SIEROSTATO DONATORE		
HCMV D+R+	23 (63.9%)	8 (66.7%)
HCMV D- R+	13 (36.1%)	4 (33.3%)
PATOLOGIA DI BASE		
LEUCEMIA LINFOBLASTICA ACUTA	5 (13.89%)	1 (8.33%)
LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA	15 (41.67%)	6 (50%)
SINDROME MIELODISPLASTICHE	4 (11.11%)	2 (16.67%)
MALATTA MIELOPROLIFERATIVA	4 (11.11%)	1 (8.33%)
LINFOMA NON-HODGKIN	4 (11.11%)	1 (8.33%)
LEUCEMIA PROLIFERATIVA T	1 (2.78%)	0 (0%)
LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA	2 (5.56%)	0 (0%)
NEOPLASIA	1 (2.78%)	0 (0%)
LINFOMA HODGKIN	0 (0%)	1 (8.33%)
TERAPIA PRE- SINTOMATICA		
VALGANCICLOVIR		8 (66.7%)
FOSCARNET		1 (8.3%)
GANCICLOVIR		3 (25%)

Legenda. CTR: controllers; NON-CTR: non- controllers; D: donatore; R: ricevente

7.2 *Evoluzione della risposta immunitaria T HCMV-specifica al giorno +100 e al giorno +180 post-trapianto*

Le analisi sono state condotte su una coorte di 48 pazienti, nei quali la risposta immunitaria T-cellulare HCMV-specifica è stata valutata al termine della profilassi con il LTV (+100 giorni dal trapianto) e al giorno +180 post-trapianto.

Per la valutazione della risposta immunitaria sono stati impiegati tre differenti saggi: il test commerciale T-SPOT.CMV (Oxford Immunotec Ltd., Regno Unito), eseguito su PBMC, basato su stimolazione con pool di peptidi sovrapposti (15-mer con overlap di 11 amminoacidi) derivati dalle proteine immunodominanti CMV pp65 e IE-1; il test QuantiFERON-CMV (Qiagen, Germania), eseguito su sangue intero, che prevede la stimolazione con due pool di peptidi HLA di classe I ristretti derivati dalle proteine pp65 e IE-1; e un saggio IGRA “home-made” (pp65-IGRA), eseguito anch’esso su sangue intero, basato su stimolazione con antigeni derivati dalla proteina pp65, includenti sia un pool di peptidi sovrapposti sia la proteina ricombinante pp65.

Come illustrato nella figura 10, tutti i saggi evidenziano un incremento della risposta immunitaria T-cellulare HCMV-specifica tra il giorno +100 e il giorno +180.

Tale incremento risulta statisticamente significativo e indica un progressivo recupero dell’immunità cellulo-mediata nel periodo considerato (Figura 10 A-E).

L’analisi delle singole traiettorie mostra tuttavia una marcata eterogeneità interindividuale, con una ricostituzione immunologica più rapida e più efficiente nella maggior parte dei soggetti.

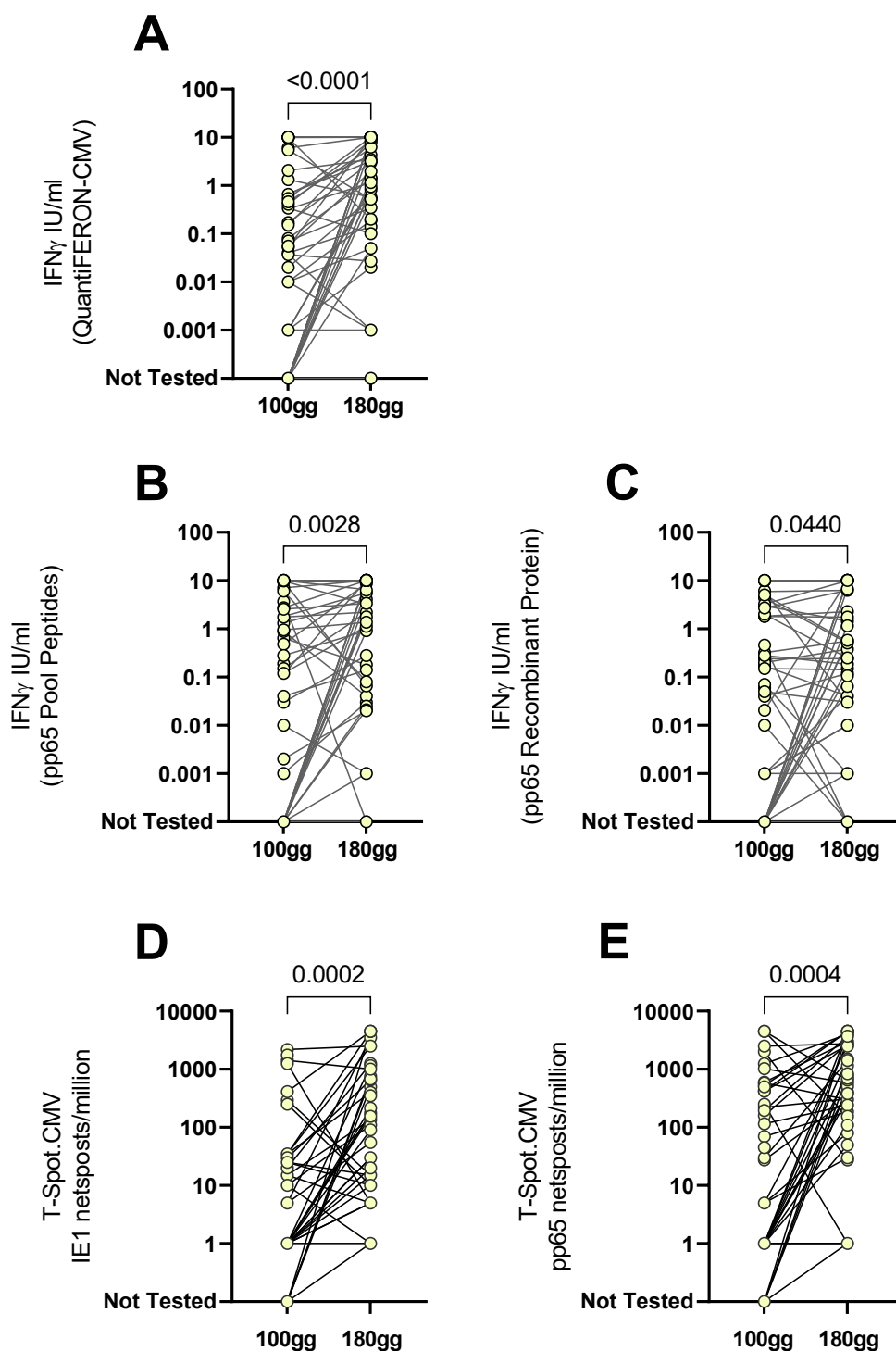


Figura 10. Evoluzione della risposta immunitaria T HCMV-specifica al giorno +100 e al giorno +180 post-trapianto. Livelli di $\text{IFN}\gamma$ IU/ml misurati con QuantiFERON-CMV (A) e pp65.IGRA dopo stimolazione con pool di peptidi derivante dalla proteina pp65 (B), pp65 in formulazione di proteina ricombinante (C). Numero di spot/milione di cellule dopo stimolazione con pool di peptidi di IE1 (D) e pp65 (E). Ogni linea grigia rappresenta l'andamento longitudinale di un singolo paziente. La significatività statistica è stata calcolata mediante il test di Wilcoxon per dati appaiati (*Wilcoxon signed-rank test*).

7.3 Confronto della risposta immunitaria cellulo-mediata CMV-specifica tra i gruppi CTR e N-CTR.

Al fine di valutare il potenziale ruolo predittivo della risposta immunitaria T-cellulare HCMV-specifica, i pazienti sono stati stratificati in due gruppi, CTR a N-CTR, sulla base del controllo virologico successivo alla sospensione della profilassi con LTV al giorno +100 post-trapianto.

Il giorno +100 rappresenta un punto temporale critico, in quanto coincide con la sospensione della profilassi antivirale e con l'inizio di una fase caratterizzata da un aumentato rischio di riattivazione del HCMV. In questo contesto, la risposta immunitaria dell'ospite potrebbe diventare un determinante fondamentale per il controllo della replicazione virale.

Sulla base di tale razionale, è stata ipotizzata l'esistenza di una differente capacità di risposta immunitaria T-cellulare HCMV-specifica tra i due gruppi. Per testare questa ipotesi, la risposta immunitaria è stata valutata al giorno +100 mediante tre differenti saggi immunologici (T-SPOT.CMV, QuantiFERON-CMV e IGRA "home-made" anti-pp65). I grafici riportati (Figura 11) mostrano la distribuzione dei valori individuali nei due gruppi per ciascun test.

Nel complesso, tutti i saggi IGRA eseguiti su sangue intero evidenziano una risposta immunitaria HCMV-specifica significativamente più elevata nei CTR rispetto ai N-CTR al giorno +100 (Figura 11 A-C). In particolare, i N-CTR mostrano livelli di risposta più bassi, frequentemente prossimi ai limiti di rilevabilità. La mediana (IQR) della risposta era pari a 0,07 (0,001–0,99) UI/ml di IFN- γ nei CTR e 0,0001 (0,0001–0,01) UI/ml di IFN- γ nei N-CTR ($p = 0,0083$) secondo il QuantiFERON.CMV; a 0,19 (0,0001–4.85) UI/ml di IFN- γ nei CTR e 0,0001 (0,0001–0,01) UI/ml di IFN- γ nei N-CTR ($p = 0,0078$) secondo pp65-IGRA dopo stimolazione con pool di peptidi di pp65 e 0,15 (0,0005–2.85) nei CTR e 0,0001(0,0001–0,05) nei N-CTR ($p = 0,015$) secondo pp65-IGRA dopo stimolazione con proteina ricombinate.

Analogamente a quanto appena descritto anche la frequenza di linfociti T IE1-specifici (Figura 12D) e pp65-specifici (Figura 12E) determinata mediante T-SPOT.CMV risultava maggiore nei CTR rispetto ai N-CTR. La mediana (IQR) del numero di spot IE1- specifici per 10^6 PBMC (Figura 11D) era 10 (1–35) nei CTR e 1 (0,1–1) nei N-CTR ($p = 0,018$) secondo T-SPOT. Per ciò che concerne il numero di spot pp65- specifici per 10^6 PBMC la mediana (IQR) misurata è 220.0 (1–600) nei CTR e 1 (0,1–1) nei N-CTR ($p = 0,0005$).

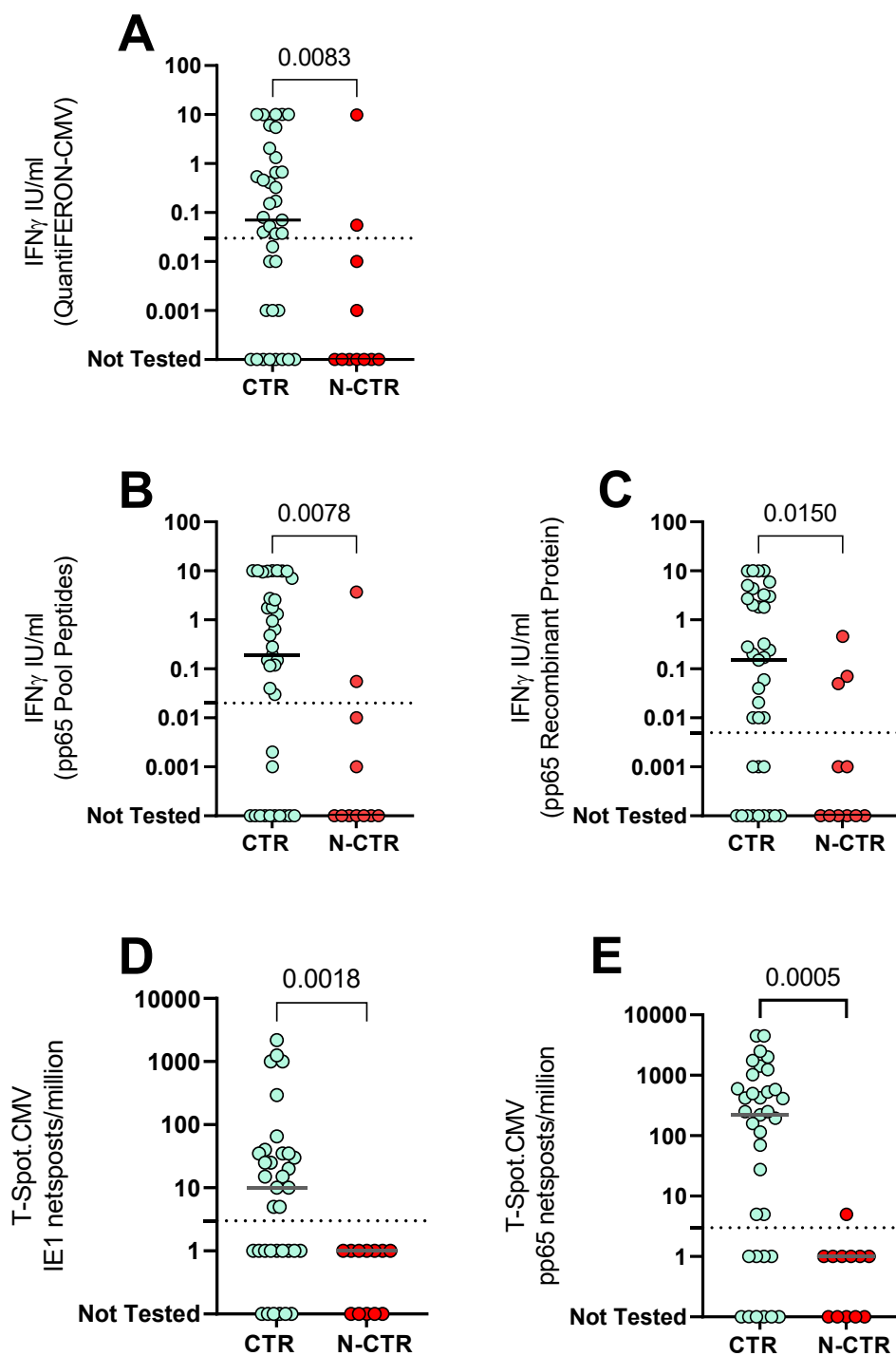


Figura 11. Confronto della risposta immunitaria cellulo-mediata CMV-specifica tra i gruppi CTR e N-CTR al giorno +100 post-trapianto.

Livelli di IFN- γ IU/ml misurati con QuantiFERON-CMV (A) e pp65.IGRA dopo stimolazione con pool di peptidi derivante dalla proteina pp65 (B), pp65 in formulazione di proteina ricombinante (C). Numero di spot/milione di cellule dopo stimolazione con pool di peptidi di IE1 (D) e pp65 (E). Nei grafici, ciascun punto rappresenta un singolo paziente, mentre le linee orizzontali indicano la mediana. Le linee tratteggiate rappresentano i cut-off di sensibilità dei saggi. I valori di p sono stati calcolati mediante test di Mann-Whitney. CTR: Controlli; N-CTR: Non-Controller.

7.4 *Valutazione della performance diagnostica dei saggi immunologici*

Mediante analisi ROC (Figura 12A-E) sono stati definiti i cut-off ottimali per discriminare i due gruppi di pazienti, e sono stati calcolati i valori diagnostico e prognostici dei diversi test (Tabella 3). Sono stati calcolati i principali parametri di accuratezza, includendo sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (PPV), valore predittivo negativo (NPV), cut-off ottimale e relativi intervalli di confidenza.

Tali metriche consentono di quantificare la capacità di ciascun test di discriminare correttamente tra soggetti CTR e N-CTR, in relazione allo stato di controllo virologico.

In particolare, la sensibilità e la specificità permettono di valutare rispettivamente la capacità del test di identificare correttamente i veri positivi e i veri negativi, mentre PPV e NPV forniscono informazioni sull'affidabilità del risultato test positivo o negativo nella popolazione studiata. L'analisi complessiva di questi parametri, integrata con le curve ROC, consente quindi di identificare il saggio con le migliori prestazioni discriminanti e la maggiore utilità applicativa in ambito clinico.

Alla luce dei dati ottenuti, il test ELISPOT commerciale T-SPOT.CMV ha mostrato le migliori performance diagnostiche complessive. Un valore soglia di 16 netspot pp65-specifici/10⁶ cellule, misurati tramite T-SPOT dopo stimolazione con pp65, presentava un Valore Predittivo Positivo (VPP) del 100% e un Valore Predittivo Negativo (VPN) del 50% nell'identificazione dei CTR.

Tuttavia, considerando esclusivamente i saggi eseguiti su sangue intero, le migliori prestazioni sono state osservate nel saggio pp65-IGRA sviluppato internamente, in particolare utilizzando come stimolo un pool peptidico derivato dalla proteina pp65. Quest'ultimo presenta infatti un Valore Predittivo Positivo (VPP) del 95,45% e un Valore Predittivo Negativo (VPN) del 41,6% nell'identificazione dei CTR. (Tabella 3).

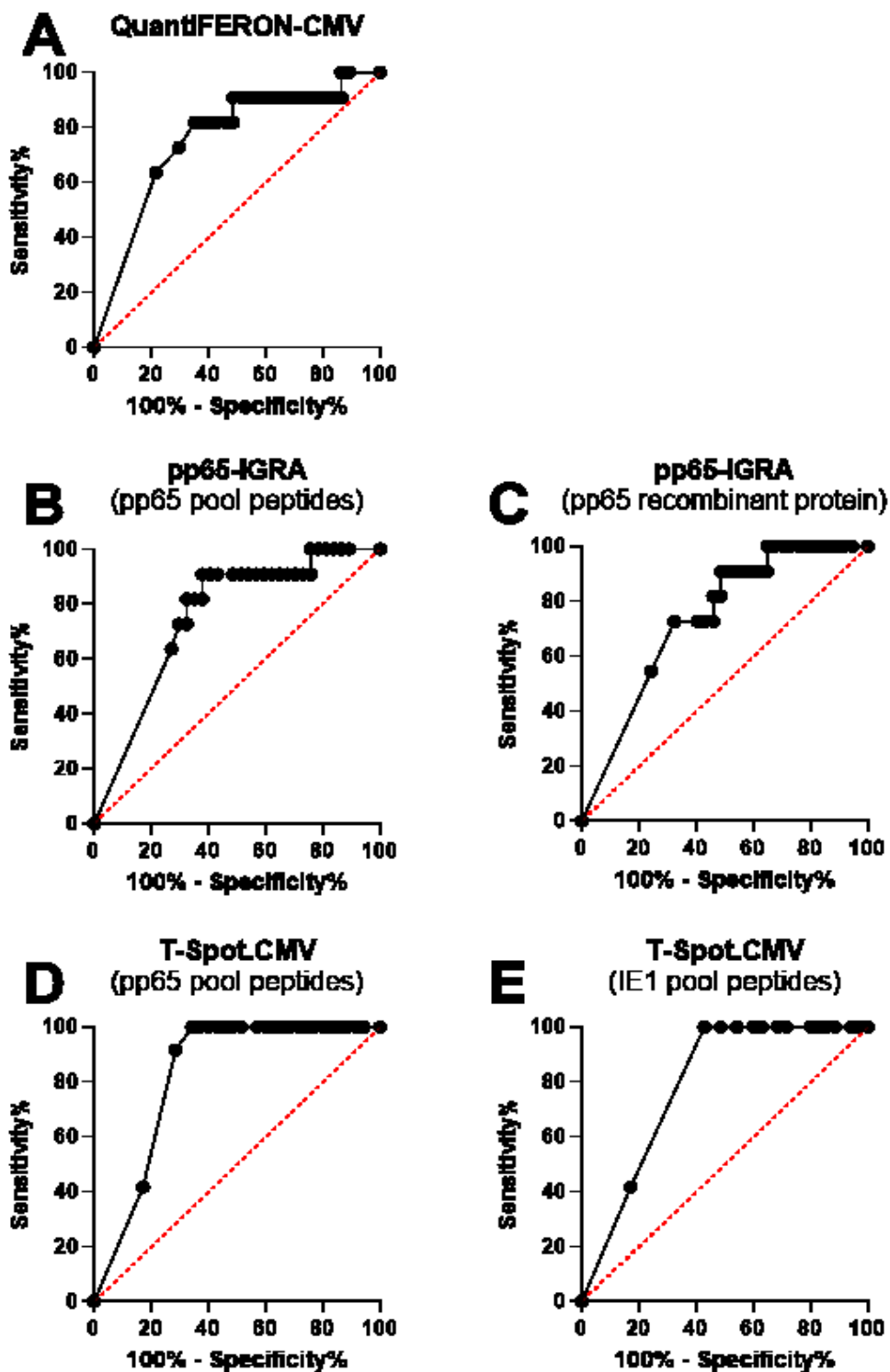


Figura 12. Valutazione della performance diagnostica dei saggi immunologici mediante curva ROC.

	CUT- OFF	Sensibilità%	95% IC	Specificità%	95% IC	VPP%	VPN%
T-SPOT.CMV PP65	< 16	100	75.75- 100	65.71	49.15- 79.17	100	50
T-SPOT.CMV IE1	< 3	100	75.75- 100	57.14	40.86- 72.02	100	44.4
PP65.IGRA pp65 pool peptidi	< 0.9	90.91	62.26- 99.53	62.16	46.10- 75.94	95.45	41.6
PP65.IGRA pp65 proteina ricombinante	< 0.1	90.91	62.26- 99.53	51.35	35.89- 66.55	95	35.7
QNT-Oiagen CMV	<0.015	81.82	52.3- 96.77	64.68	48.76- 78.17	92.3	40.9

Tabella 3. Prestazioni prognostiche di diversi test immunologici e determinazione dei valori di cut-off per la risposta protettiva delle cellule T. CI: intervallo di confidenza, PPV: valore predittivo positivo, NPV: valore predittivo negativo.

8 DISCUSSIONE

L'infezione da HCMV continua a rappresentare una delle principali complicanze infettive nei pazienti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (HSCT), in particolare durante le fasi di profonda immunodepressione successive al trapianto. L'introduzione della profilassi antivirale con LTV ha determinato un importante cambiamento nella gestione dell'infezione da HCMV, riducendo significativamente l'incidenza delle riattivazioni precoci, delle infezioni clinicamente significative e delle complicanze HCMV-correlate nei pazienti HSCT (Gabanti et al., 2022). Infatti, prima dell'introduzione del LTV in profilassi, l'unica strategia di gestione delle infezioni da HCMV nei pazienti riceventi HSCT era l'approccio pre-emptivo mediante somministrazione di farmaci inibitori della polimerasi virale in caso di infezione clinicamente significativa (Ljungman et al., 1996). Tuttavia, l'utilizzo di questi farmaci si associava sovente a mielotossicità o nefrotossicità che inficiavano il successo stesso del trapianto.

Da un punto di vista virologico, l'utilizzo di LTV in profilassi ha ridotto l'incidenza delle riattivazioni durante il periodo di somministrazione del farmaco, essendo stato dimostrato che la presenza di HCMV DNAemia è nella maggior parte dei casi da associarsi a infezioni abortive, ovvero presenza di DNA libero non associato a virioni infettanti (Cassaniti et al., 2021). È stato osservato che la ricostituzione immunologica HCMV-specifica nei pazienti in profilassi avviene in maniera ritardata rispetto ai pazienti trattati con approccio pre-emptivo (Gabanti et al., 2022), raggiungendo livelli protettivi tra i 100 e i 120 giorni dopo rispetto al gruppo di controllo. L'incidenza delle infezioni clinicamente significative, tuttavia, non sembrano differire significativamente tra i due gruppi anche se, proprio a causa della pressione farmacologica del LTV nei primi 100 giorni post-trapianto, nel gruppo dei pazienti in profilassi le riattivazioni significative sono normalmente osservate dopo l'interruzione di LTV.

In questo contesto, la valutazione funzionale dell'immunità T HCMV-specifica ha assunto un ruolo di crescente interesse, sia come potenziale strumento prognostico sia come supporto nella stratificazione del rischio di riattivazione virale post-profilassi. Le attuali linee guida (come quelle dell'American Society for Transplantation and Cellular Therapy aggiornate nel 2025) e le raccomandazioni dei gruppi di studio italiani (GITMO, AMCLI, etc.) confermano che il monitoraggio della risposta T HCMV-specifica per valutare il rischio di infezione da HCMV (Kotton et al., 2018, Thompson et al., 2022) è fondamentale per valutare il rischio di

infezione, specialmente nei pazienti immunocompromessi. I test ELISpot (es. T.Spot.CMV o T-TRACK-CMV) o QuantiFERON-CMV sono stati ampiamente utilizzati per monitorare la ricostituzione o lo sviluppo ex novo della risposta delle cellule T specifiche per l'HCMV nel periodo post-trapianto (Thompson et al., 2022, Chemaly et al., 2020) e per personalizzare la durata della profilassi antivirale nei trapiantati di organo solido (Avetisyan et al., 2007, Navarro et al., 2016, Kumar et al., 2017). Ad oggi sono ancora limitate, in letteratura, le osservazioni sulla valutazione della risposta T specifica per HCMV e sul suo valore prognostico nel predire il rischio di infezione da HCMV clinicamente significativa dopo profilassi con LTV.

Alla luce di queste considerazioni, il presente studio è stato progettato con l'obiettivo di confrontare differenti approcci immunologici per la valutazione della risposta T HCMV-specifica nei pazienti sottoposti a HSCT, analizzandone sia le performance diagnostiche sia il potenziale valore predittivo nei confronti del controllo virologico dopo sospensione della profilassi con LTV. A tale scopo abbiamo utilizzato e confrontato direttamente 2 test standardizzati attualmente disponibili in commercio (T-SPOT.CMV e QuantiFERON-CMV) e un nuovo saggio pp65-IGRA, sviluppato nel nostro laboratorio, che si basa sulla stimolazione di sangue intero con due formulazioni diverse dell'antigene pp65 (Paragrafo 6.5).

Sono stati esaminati 48 pazienti arruolati nello studio CMV-break per un periodo di follow-up di 180 giorni dal trapianto. I test immunologici HCMV-specifici sono stati eseguiti a 100 giorni (termine della profilassi) e a 180 giorni, in parallelo alla determinazione della conta assoluta delle sottopopolazioni dei linfociti T.

Dopo l'interruzione della profilassi con LTV, 11/48 pazienti (22,9%, Non-Controller) hanno sviluppato un'infezione clinicamente significativa da HCMV che ha richiesto la somministrazione di terapia antivirale pre-emptive, mentre 37/48 (77,1%, Controller) hanno controllato spontaneamente l'infezione.

I nostri dati mostrano, inoltre, come la risposta immunitaria T HCMV-specifica aumenti progressivamente tra il giorno +100 e il giorno +180 post-trapianto, indipendentemente dalla metodica utilizzata. Tale andamento appare coerente con il fisiologico processo di ricostituzione immunitaria che caratterizza i pazienti sottoposti a HSCT.

L'analisi delle traiettorie individuali evidenzia una marcata eterogeneità interindividuale nella cinetica di ricostituzione immunologica. Sebbene la maggior parte dei pazienti mostri

un incremento progressivo della risposta immunitaria, alcuni soggetti mantengono livelli ridotti o scarsamente rilevabili anche al giorno +180. Questo dato suggerisce che il recupero dell'immunità T HCMV-specifica non avvenga con le stesse tempistiche in tutti i pazienti e che una quota di soggetti possa rimanere immunologicamente vulnerabile più a lungo nel periodo post-trapianto.

Dal punto di vista clinico, tali osservazioni assumono particolare rilevanza considerando che, nonostante l'elevata efficacia del LTV durante il periodo di profilassi, una quota non trascurabile di pazienti sviluppa riattivazioni tardive dopo la sospensione del trattamento, generalmente oltre il giorno +100 post-trapianto (Gabanti et al., 2022). Questa fase rappresenta un momento particolarmente critico, poiché il controllo dell'infezione non dipende più dalla soppressione farmacologica della replicazione virale, ma dalla capacità del paziente di aver sviluppato una risposta immunitaria cellulo-mediata HCMV-specifica adeguata. Ne consegue che la valutazione immunologica in questo momento potrebbe assumere un potenziale valore predittivo rispetto all'andamento virologico successivo tra il giorno +100 e +180.

I nostri dati, infatti, mostrano che la valutazione della risposta linfocitaria T HCMV-specifica, in particolare quella pp65-specifica, è un predittore robusto del controllo dell'infezione. Inoltre, la concordanza osservata tra i diversi saggi immunologici suggerisce che tale differenza non sia legata alla piattaforma analitica, ma rifletta una reale disfunzione della risposta immunitaria nei pazienti "*Non-Controller*".

In accordo con la letteratura, tali osservazioni confermano che la risposta T HCMV-specifica, in particolare verso antigeni immunodominanti come pp65 e IE1, rappresenta un importante correlato immunologico di protezione, mentre la sola quantificazione linfocitaria globale non è sufficiente a predire il controllo dell'infezione (Mele et al., 2025).

Tra tutti il T-SPOT.CMV basato sulla stimolazione con pool di peptidi sovrapposti dell'intera proteina pp65, con un valore predittivo positivo (PPV) uguale al 100%, ha mostrato le migliori performance analitiche complessive. Il valore predittivo dei linfociti T specifici per IE1 e del QuantiFERON-CMV è risultato inferiore.

Interessante notare come il nuovo pp65-IGRA, basato anch'esso sulla stimolazione con pool di peptidi sovrapposti dell'intera proteina pp65, abbia mostrato prestazioni comparabili al T-Spot CMV (PPV > 95%, vedi Tabella 2) e superiori al test commerciale QUANTIferon.CMV,

suggerendo un potenziale valore aggiunto sia in termini di accuratezza sia di flessibilità metodologica.

La bassa performance del QuantiFERON-CMV può essere attribuita al suo disegno, che stimola prevalentemente la componente linfocitaria di tipo CD8+ e risulta maggiormente influenzato dalla variabilità HLA interindividuale, fattori che possono limitarne la capacità discriminante nei pazienti con assetti immunogenetici eterogenei (Gabanti et al., 2016). Inoltre, è stato riportato che la risposta dei linfociti T CD4+ specifici per HCMV è cruciale per il controllo immunitario della viremia da CMV dopo trapianto (Rentenaar et al., 2000, Gamadia et al., 2003, Lilleri et al., 2008, Gerna et al., 2006, Haidar et al., 2020) perciò, la sola rilevazione della risposta dei linfociti T CD8+ potrebbe non essere sufficiente a valutare la protezione immunitaria dall'infezione da HCMV. Al contrario, T-SPOT, che utilizza peptidi sovrapposti di 15 aminoacidi, e pp65-IGRA, che utilizza sia un pool di peptidi sovrapposti di pp65 che la proteina intera, forniscono una valutazione globale della risposta immunitaria consentendo la stimolazione e la rilevazione della risposta sia di tipo CD4+ che CD8+ indipendentemente dal tipo di HLA del paziente.

In conclusione, il presente studio conferma che la quantificazione della risposta T HCMV-specifica rappresenta un indicatore funzionale altamente informativo del rischio di riattivazione virale dopo sospensione della profilassi con LTV.

La possibilità di identificare precocemente i pazienti con risposta immunitaria subottimale al giorno +100 apre quindi la strada a strategie di stratificazione del rischio e di gestione personalizzata della profilassi antivirale. Nel loro insieme, i risultati indicano che, sebbene il T-SPOT.CMV rappresenti il test più sensibile dal punto di vista analitico, i saggi IGRA su sangue intero basati su pp65 costituiscono l'approccio più bilanciato tra semplicità di esecuzione, performance diagnostica e trasferibilità clinica. Pertanto, l'integrazione di questi test con il monitoraggio virologico non rappresenta soltanto un miglioramento metodologico, ma un reale avanzamento concettuale verso un approccio di medicina di precisione nella gestione del paziente trapiantato, consentendo di modulare durata della profilassi e intensità del follow-up in base al profilo immunologico individuale.

9 BIBLIOGRAFIA

- Antonelli G, Clementi M. *Principi di Virologia Medica*. 2nd ed. Milano: EdiSES; 2007.
- Appelbaum FR. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *N Engl J Med*. 2007;357(15):1472–1475.
- Avetisyan G, Aschan J, Häggglund H, Ringdén O, Ljungman P. Evaluation of intervention strategy based on CMV-specific immune responses after allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2007; 40:865-869.
- Baldanti F, Silini E, Sarasini A, Talarico CL, Stanat SC, Biron KK, et al. A three-nucleotide deletion in the UL97 open reading frame is responsible for ganciclovir resistance of human cytomegalovirus. *J Virol*. 1995;69:796-800.
- Baldanti F, Underwood MR, Talarico CL, Simoncini L, Sarasini A, Biron KK, Gerna G. The Cys607→Tyr change in the UL97 phosphotransferase confers ganciclovir resistance to human cytomegalovirus strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42:444-446.
- Balletto E, Mikulska M. Bacterial Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2015;7: e2015045.
- Berry R, Watson GM, Jonjic S, et al. Modulation of innate and adaptive immunity by cytomegaloviruses. *Nat Rev Immunol*. 2020;20:113-127.
- Bodéus M, Hubinont C, Bernard P, Bouckaert A, Thomas K, Goubau P. Prenatal diagnosis of human cytomegalovirus by culture and polymerase chain reaction: 98 pregnancies leading to congenital infection. *Prenat Diagn*. 1999;19:314-317.
- Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, Stagno S, Pass RF. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics*. 1999;104:55-60.
- Britt WJ, Prichard MN. New therapies for human cytomegalovirus infections. *Antiviral Res*. 2018;159:153-174.
- Camargo JF, Komanduri KV. Emerging concepts in cytomegalovirus infection following hematopoietic stem cell transplantation. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2017;10:233-238.
- Cassaniti I, Colombo AA, Bernasconi P, Malagola M, Russo D, Iori AP, Girmenia C, Greco R, Peccatori J, Ciceri F, Bonifazi F, Percivalle E, Campanini G, Piccirilli G,

Lazzarotto T, Baldanti F. Positive HCMV DNAemia in stem cell recipients undergoing letermovir prophylaxis is expression of abortive infection. *Am J Transplant.* 2021;21:1622-1628.

Chemaly RF, El Haddad L, Winston DJ, Rowley SD, Mulane KM, Chandrasekar P, Avery RK, Hari P, Peggs KS, Kumar D, Nath R, Ljungman P, Mossad SB, Dadwal SS, Blanchard T, Shah DP, Jiang Y, Ariza-Heredia E. Cytomegalovirus (CMV) Cell-Mediated Immunity and CMV Infection After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: The REACT Study. *Clin Infect Dis.* 2020;71:2365-2374.

Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2006;354:1813–1826.

Davis NL, King CC, Kourtis AP. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *Birth Defects Res.* 2017;109:336-346.

Dollard SC, Staras SA, Amin MM, Schmid DS, Cannon MJ. National prevalence estimates for cytomegalovirus IgM and IgG avidity and association between high IgM antibody titer and low IgG avidity. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18:1895-1899.

Erard V, Katherine A. Guthrie, Sachiko Seo, Jeremy Smith, MeeiLi Huang, Jason Chien, Mary E. D. Flowers, Lawrence Corey, Michael Boeckh, Reduced Mortality of Cytomegalovirus Pneumonia After Hematopoietic Cell Transplantation Due to Antiviral Therapy and Changes in Transplantation Practices, *Clin Infect Dis.* 2015;61:31-39.

Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, Martin P, Chien J, Przepiorka D, Couriel D, Cowen EW, Dinndorf P, Farrell A, Hartzman R, Henslee-Downey J, Jacobsohn D, McDonald G, Mittleman B, Rizzo JD, Robinson M, Flowers MED. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2005;11:945-956.

Fisher S, Genbacev O, Maidji E, Pereira L. Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: implications for transmission and pathogenesis. *J Virol.* 2000;74:6808-6820.

Fletcher CV, Balfour HH. Evaluation of Ganciclovir for Cytomegalovirus Disease. *DICP.* 1989;23:5-12

Foolad F, Aitken SL, Chemaly RF. Letermovir for the prevention of cytomegalovirus infection in adult cytomegalovirus-seropositive hematopoietic stem cell transplant recipients. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2018;11:931-941.

Forte E, Zhang Z, Thorp EB and Hummel M. Cytomegalovirus Latency and Reactivation: An Intricate Interplay With the Host Immune Response. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2020;10:130.

Fowler KB, Pass RF. Risk factors for congenital cytomegalovirus infection in the offspring of young women: exposure to young children and recent onset of sexual activity. *Pediatrics*. 2006;118:e 286-292.

Gabanti E, Borsani O, Colombo AA, Zavaglio F, Binaschi L, Caldera D, Sciarra R, Cassinelli G, Alessandrino EP, Bernasconi P, Ferretti VV, Lilleri D, Baldanti F. Human Cytomegalovirus-Specific T-Cell Reconstitution and Late-Onset Cytomegalovirus Infection in Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients following Letermovir Prophylaxis. *Transplant Cell Ther*. 2022; 28: 211.e1-211.e9.

Gabanti E, Bruno F, Scaramuzzi L, Mangione F, Zelini P, Gerna G, Lilleri D. Predictive value of human cytomegalovirus (HCMV) T-cell response in the control of HCMV infection by seropositive solid-organ transplant recipients according to different assays and stimuli. *New Microbiol*. 2016;39:247-258.

Gamadia LE, Remmerswaal EB, Weel JF, Bemelman F, van Lier RA, Ten Berge IJ. Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease. *Blood*. 2003;101:2686-2692.

Gentry BG, Bogner E, Drach JC. Targeting the terminase: An important step forward in the treatment and prophylaxis of human cytomegalovirus infections. *Antiviral Res*. 2019;161:116-124.

Gentry BG, Gentry SN, Jackson TL, Zemlicka J, Drach JC. Phosphorylation of antiviral and endogenous nucleotides to di- and triphosphates by guanosine monophosphate kinase. *Biochem Pharmacol*. 2011;81(1):43–49.

Gerna G, Lilleri D, Fornara C, Comolli G, Lozza L, Campana C, Pellegrini C, Meloni F, Rampino T. Monitoring of human cytomegalovirus-specific CD4 and CD8 T-cell immunity in patients receiving solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2006;6:2356-2364.

- Gerna G, Lilleri D, Furione M, Baldanti F. Management of human cytomegalovirus infection in transplantation: validation of virologic cut-offs for preemptive therapy and immunological cut-offs for protection. *New Microbiol.* 2011;34:229-254.
- Gerna G, Kabanova A, Lilleri D. Human Cytomegalovirus Cell Tropism and Host Cell Receptors. *Vaccines (Basel).* 2019;7:70.
- Grgić I, Gorenec L. CMV genetic diversity and resistance. *Trop Med Infect Dis.* 2024;9:49.
- Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J Pathol.* 2015;235:288-297.
- Kabanova A, Perez L, Lilleri D, Marcandalli J, Agatic G, Becattini S, Preite S, Fuschillo D, Percivalle E, Sallusto F, Gerna G, Corti D, Lanzavecchia A. Antibody-driven design of a human cytomegalovirus gHgLpUL128L subunit vaccine that selectively elicits potent neutralizing antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:17965-17970.
- Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Huprikar S, Chou S, Danziger-Isakov L, Humar A; The Transplantation Society International CMV Consensus Group. The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. *Transplantation.* 2018;102:900-931.
- Kumar D, Mian M, Singer L, Humar A. An Interventional Study Using Cell-Mediated Immunity to Personalize Therapy for Cytomegalovirus Infection After Transplantation. *Am J Transplant.* 2017;17:2468-2473.
- Haidar G, Boeckh M, Singh N. Cytomegalovirus Infection in Solid Organ and Hematopoietic Cell Transplantation: State of the Evidence. *J Infect Dis.* 2020;221(Suppl 1):S23-S31.
- Hanley PJ, Bollard CM. Controlling Cytomegalovirus: Helping the Immune System Take the Lead. *MDPI Viruses.* 2014;6:2242–2258.
- Holtappels R, Schader SI, Oettel O, Podlech J, Seckert CK, Reddehase MJ, Lemmermann NAW. Insufficient antigen presentation due to viral immune evasion explains lethal cytomegalovirus organ disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:157.

Jackson SE, Mason GM, Wills MR. Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. *Virus Res.* 2011;157:151-160.

Jean Beltran PM, Cristea IM. The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert Rev Proteomics.* 2014;11:697-711.

Lilleri D, Fornara C, Chiesa A, Caldera D, Alessandrino EP, Gerna G. Human cytomegalovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell reconstitution in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients and immune control of viral infection. *Haematologica.* 2008;93:248-256.

Lilleri D, Fornara C, Revello MG, Gerna G. Human cytomegalovirus-specific memory CD8⁺ and CD4⁺ T cell differentiation after primary infection. *J Infect Dis.* 2008;198:536-543.

Lim EY, Jackson SE, Wills MR. The CD4⁺ T Cell Response to Human Cytomegalovirus in Healthy and Immunocompromised People. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:202.

Liu KY, Wang Y, Han MZ, Huang H, Chen H, Liu QF, Wang JM, Liu T, Song YP, Ma J, Wu DP, Zou P, Huang XJ. Valganciclovir for pre-emptive therapy of cytomegalovirus viraemia after hematopoietic stem cell transplantation: a prospective multi-center trial. *Chin Med J (Engl).* 2010;123:2199-2205.

Ljungman P, Boeckh M, Hirsch HH, Josephson F, Lundgren J, Nichols G, Pikis A, Razonable RR, Miller V, Griffiths PD, et al. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant patients for use in clinical trials. *Clin Infect Dis.* 2017;64:87-91.

Ljungman P, Oberg G, Aschan J, Ehrnst A, Lönnqvist B, Pauksen K, Sulila P. Foscarnet for pre-emptive therapy of CMV infection detected by a leukocyte-based nested PCR in allogeneic bone marrow transplant patients. *Bone Marrow Transplant.* 1996;18:565-568.

Loscalzo J, Fauci AS, Kasper DL, et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine.* 21st ed. New York: McGraw-Hill; 2022.

Lurain NS, Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23:689-712.

Maresca R, Varca S, Di Vincenzo F, Ainora ME, Mignini I, Papa A, Scaldaferrì F, Gasbarrini A, Giustiniani MC, Zocco MA, Laterza L. Cytomegalovirus Infection: An Underrated Target in Inflammatory Bowel Disease Treatment. *J Clin Med.* 2023;13:130.

Milone, G.; Leotta, S.; Cupri, A. Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Recent Advances. *J. Clin. Med.* 2025, 14, 3379.

Mele D, Zavaglio F, Bergami F, Gregorini M, Briganti DF, Pellegrini C, Comolli G, Cassaniti I, Lilleri D and Baldanti F. Performance of new pp65-IGRA for the quantification of HCMV-specific CD4+ T-cell response in healthy subjects and in solid organ transplant recipients. *Front. Immunol.* (2025)

Navarro D, Amat P, de la Cámara R, López J, Vázquez L, Serrano D, Nieto J, Rovira M, Piñana JL, Giménez E, Solano C. Efficacy and Safety of a Preemptive Antiviral Therapy Strategy Based on Combined Virological and Immunological Monitoring for Active Cytomegalovirus Infection in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients. *Open Forum Infect Dis.* 2016;3:ofw107.

Nicloux M, Peterman L, Parodi M, Magny JF. Congenital CMV management. *Arch Pediatr.* 2020;27:160-165.

Paintsil E, Cheng YC. Antiviral agents. *Encycl Microbiol.* 2009.

Park B, Oh H, Lee S, Song Y, Shin J, Sung YC, Hwang SY, Ahn K. The MHC class I homolog of human cytomegalovirus is resistant to down-regulation mediated by the unique short region protein (US)2, US3, US6, and US11 gene products. *J Immunol.* 2002;168:3464-3469.

Pass RF, Fowler KB, Boppana SB, Britt WJ, Stagno S. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: Symptoms at birth and outcome. *Journal of Clinical Virology.* 2006;35:216-220.

Perrottet N, Decosterd LA, Meylan P, Pascual M, Biollaz J, Buclin T. Valganciclovir in adult solid organ transplant recipients: pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics and clinical interpretation of plasma concentration measurements. *Clin Pharmacokinet.* 2009;48:399-418.

Picone O, Vauloup-Fellous C, Cordier AG, Guitton S, Senat MV, Fuchs F, Ayoubi JM, Grangeot Keros L, Benachi A. A series of 238 cytomegalovirus primary infections during pregnancy: description and outcome. *Prenat Diagn.* 2013;33:751-758.

Quinnan GV Jr, Kirmani N, Rook AH, Manischewitz JF, Jackson L, Moreschi G, Santos GW, Saral R, Burns WH. Cytotoxic T cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from

cytomegalovirus infection in bone marrow transplant recipients. *N Engl J Med.* 1982;307:7-13.

Rentenaar RJ, Gamadia LE, van DerHoek N, van Diepen FN, Boom R, Weel JF, Wertheim-van Dillen PM, van Lier RA, ten Berge IJ. Development of virus-specific CD4(+) T cells during primary cytomegalovirus infection. *J Clin Invest.* 2000;105:541-548.

Revello MG, Fabbri E, Furione M, Zavattoni M, Lilleri D, Tassis B, Quarenghi A, Cena C, Arossa A, Montanari L, Rognoni V, Spinillo A, Gerna G. Role of prenatal diagnosis and counseling in the management of 735 pregnancies complicated by primary human cytomegalovirus infection: a 20-year experience. *J Clin Virol.* 2011;50:303-307.

Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, Greenberg PD. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood.* 1991;78:1373-1380.

Rugarli C. *Medicina interna sistematica.* 8th ed. Milano: Edra; 2021.

Ryan KJ, Ray CG, editors. *Sherris & Ryan's Medical Microbiology.* 8th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2021.

Rybak-Krzyszowska M, Górecka J, Huras H, Massalska-Wolska M, Staśkiewicz M, Gach A, Kondracka A, Staniczek J, Górczewski W, Borowski D, et al. Cytomegalovirus infection in pregnancy prevention and treatment options: a systematic review and meta-analysis. *Viruses.* 2023;15:2142.

Sahin U, Toprak SK, Atilla PA, Atilla E, Demirer T. An overview of infectious complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Chemother.* 2016;22:505-514.

Singh Rahi M, Jindal V, Pednekar P, et al. Fungal infections in hematopoietic stem-cell transplant patients: a review of epidemiology, diagnosis, and management. *Therapeutic Advances in Infectious Disease.* 2021;8.

Shang Z, Li X. Human cytomegalovirus: pathogenesis, prevention, and treatment. *Mol Biomed.* 2024;5:61.

Streeck H, Frahm N, Walker BD. The role of IFN- γ ELISPOT assay in HIV vaccine research. *Nat Protoc.* 2009;4:461-469.

Thompson G, Boan P, Purtill D, Cooney J, Cannell P, Wright M, John M. QuantiFERON-cytomegalovirus to predict clinically significant cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2022;24:e13786.

Travi G, Pergam SA. Cytomegalovirus Pneumonia in Hematopoietic Stem Cell Recipients. *Journal of Intensive Care Medicine.* 2014;29:200-212.

Xia Y, Zhang J, Shui X, Wang C, Zhang S, Chai W, Yang Y, Shen L and Wang C. Recent advances in human cytomegalovirus: a comprehensive review of pathogenic mechanisms, virus-host interactions, and antiviral strategies. *Front. Immunol.* 2026;16:1636978

Ye L, Qian Y, Yu W, Guo G, Wang H and Xue X (2020) Functional Profile of Human Cytomegalovirus Genes and Their Associated Diseases: A Review. *Front. Microbiol.* 2020; 11:2104.

Zhao ZS, Shao W, Liu JK. Autologous or allogeneic hematopoietic stem cell transplantation combined with high-dose chemotherapy for refractory neuroblastoma: a protocol for systematic review and meta-analysis. *Medicine.* 2021;100:e28096

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare sinceramente la Dott.ssa Irene Cassaniti e la Dott.ssa Dalila Mele per la disponibilità, la pazienza e la professionalità con cui mi hanno seguito durante l'attività di laboratorio e la stesura di questa tesi.

La loro guida, il supporto costante e i preziosi consigli hanno rappresentato un punto di riferimento fondamentale durante tutto questo percorso.

Le ringrazio per il tempo dedicatomi e per aver contribuito, con competenza e gentilezza, alla chiusura di questo mio percorso.

Ringrazio la professoressa Maria Rosalia Pasca, relatrice di questa tesi, per la disponibilità, e per avermi dato l'opportunità di svolgere questo percorso di tesi.

Infine, desidero ringraziare la mia famiglia per avermi dato la possibilità di intraprendere questo percorso di studi e per avermi sostenuta in ogni sua fase, con pazienza, presenza costante e affetto.

Grazie per aver creduto in me anche nei momenti di difficoltà, per avermi incoraggiata quando le energie venivano meno e per avermi sempre ricordato il valore dell'impegno e della perseveranza.

Il vostro supporto, spesso silenzioso ma fondamentale, è stato una guida costante lungo tutto il mio percorso universitario e ha reso possibile il raggiungimento di questo traguardo.

Questo risultato è anche vostro.