

*Alma Mater Studiorum – Università di Bologna*

Facoltà di Medicina e Chirurgia

**DOTTORATO DI RICERCA**

Cause e Meccanismi di Infiammazione nelle Malattie dell'Apparato Digerente  
Ciclo XX

Dipartimento di Medicina Interna e Gastroenterologia  
Settore scientifico disciplinare di afferenza: MED/09 MEDICINA INTERNA

**Ruolo del Cytomegalovirus nelle malattie infiammatorie  
croniche dell'intestino: decorso di malattia e storia naturale**

Presentata dalla Dott.ssa Valeria Criscuoli

**Coordinatore Dottorato**  
**Prof. Massimo Campieri**

---

**Relatore**  
**Prof. Mario Cottone**

---

Esame finale anno 2008

## **Indice**

Introduzione	pag. 4-6
L'evidenza epidemiologica	pag. 6-8
Descrizione del virus	pag. 8-15
L'evidenza di letteratura	pag. 16-19
Diagnosi di laboratorio	pag. 20-25
Premesse allo studio	pag. 25-26
Pazienti e metodi	pag. 27-31
Risultati	pag. 32-38
Discussione	pag. 38-46
Conclusioni	pag. 47-48
Bibliografia	pag. 49-51

### **Ringraziamenti**

Prof. Mario Cottone per avere sostenuto il progetto

Dott.ssa Maria Rosa Rizzuto   Dott.ssa Elena Gallo   Dott.ssa Maria Concetta

Renda per il supporto tecnico e la disponibilità.

## **Introduzione**

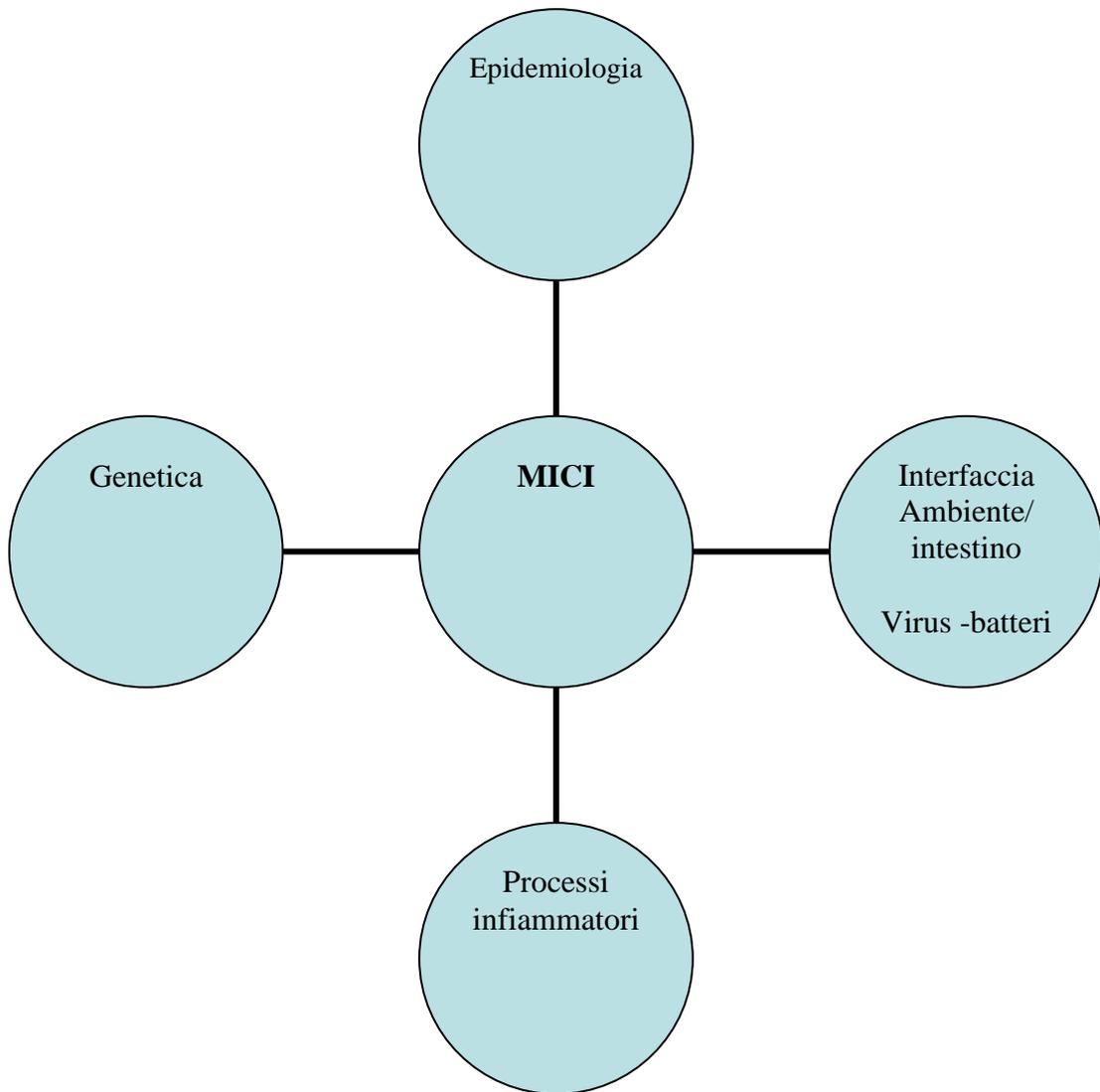
L'eziologia delle malattie infiammatorie croniche dell'intestino (MICI) non è ancora chiara. L'ipotesi attualmente più accreditata è che le MICI siano il risultato di una inappropriata ed esagerata risposta immune verso i normali costituenti della microflora intestinale mucosale residente, indotta verosimilmente da un agente esterno, in individui geneticamente predisposti (1-2). I meccanismi patogenetici ipotizzati riguardano diversi aspetti:

**Epidemiologia:** dieta, farmaci, storia vaccinale e immunità acquisita nell'infanzia, variazioni stagionali, circostanze sociali.

**Interfaccia ambiente/intestino:** batteri intraluminali, muco epiteliale, funzione di barriera, rimodellamento epiteliale, interazione epitelio/ sistema immune.

**Processi infiammatori:** traduzione del segnale, citochine, interazione con il sistema immune.

**Genetica:** regione IBD1 del cromosoma 16 (che contiene il gene di suscettibilità per la malattia di Crohn CARD 15/NOD2), IBD3, IBD5, IL23R.



Nella protezione della omeostasi mucosale un ruolo chiave viene esercitato dall'immunità cellulo-mediata che permette il mantenimento di una "infiammazione fisiologica" in risposta alla microflora intestinale ed agli antigeni esterni; tuttavia è noto che non tutti i costituenti della microflora sono patogeni nelle patologie

intestinali come è dimostrato dal ruolo antinfiammatorio e protettivo di una classe di microrganismi definiti probiotici che negli ultimi anni stanno assumendo un ruolo emergente in termini di ricerca anche per il potenziale risvolto terapeutico (3).

Tra gli agenti esterni, cofattori nella patogenesi dell'infiammazione intestinale, sono stati implicati sia i batteri che i virus. La possibile associazione tra virus e malattie infiammatorie croniche dell'intestino deriva da evidenze epidemiologiche, da studi di immunologia intestinale, da osservazioni cliniche sul decorso delle MICI con associate sovrainfezioni virali e dalle iniziali osservazioni di risposta a trattamenti immuno-modulatori intestinali.

#### **- Evidenze epidemiologiche**

Quella infettiva è una delle ipotesi più antiche per spiegare l'origine delle malattie infiammatorie intestinali, confermata negli anni da evidenze discretamente convincenti.

Diversi studi in tempi differenti hanno valutato se vi era correlazione tra la trasmissione di un agente infettivo, potenzialmente coinvolto nell'eziologia delle malattie infiammatorie, e la comparsa di nuovi casi correlati da parametri temporali o spaziali in una data area geografica. Altri studi hanno dimostrato che episodi di infezioni virali determinano la comparsa o la riattivazione di malattia infiammatorie dell'intestino (4,5,6,7).

La prima evidenza riguardo un'associazione tra malattia infiammatoria e Cytomegalovirus (CMV) risale al 1961 quando Powell (8) descrisse il caso di un giovane affetto da colite ulcerosa attiva associata al riscontro di inclusioni citomegaliche all'esame istologico delle biopsie intestinali.

Negli anni successivi in letteratura (9-14) vi è stato un susseguirsi di segnalazioni riguardanti il riscontro del virus nelle malattie infiammatorie, attribuendone una responsabilità sia in termini di esordio di MICI sia di riattivazione che di severità di decorso e megacolon tossico, riconoscendo alle proteine virali la capacità di attivare citochine pro-infiammatorie responsabili del mantenimento di una infiammazione

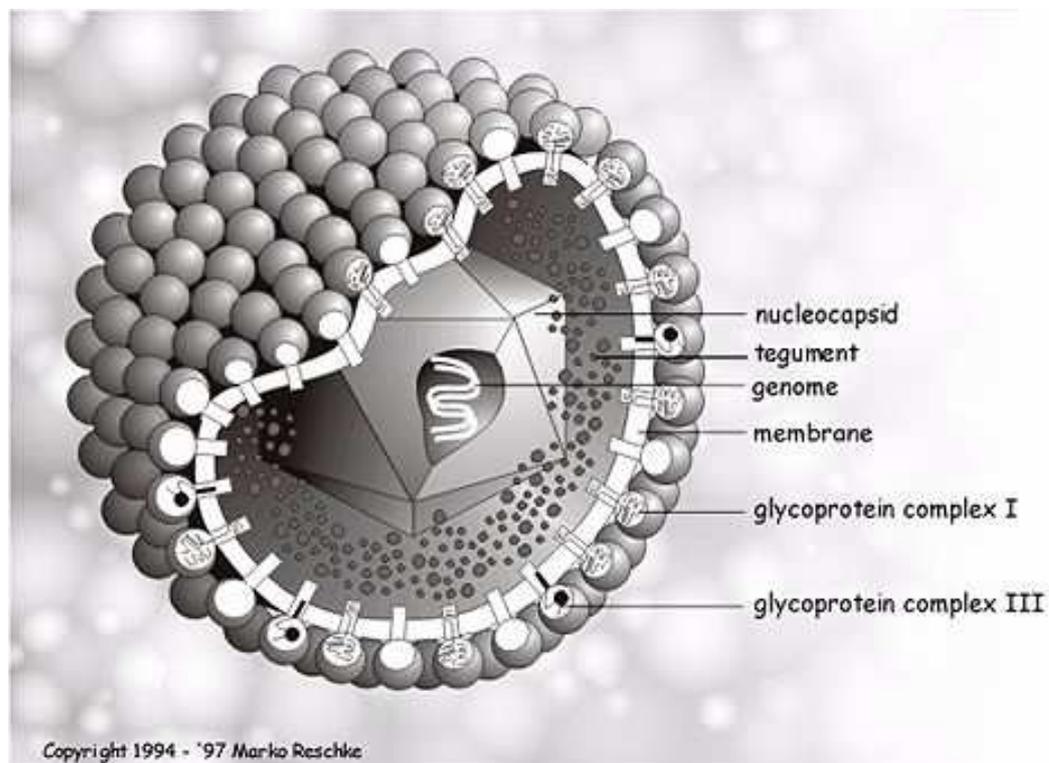
locale e dell'attivazione immune.

Il virus riconosce come sede di replicazione ideale le cellule della linea monocito-macrofagica, leucociti e cellule rapidamente proliferanti come quelle contenute nel tessuto di granulazione, in zone sede di infiammazione o nel fondo di ulcere; in questo modo può essere interpretato il riscontro occasionale in zone di colon infiammate.

### **Descrizione del virus**

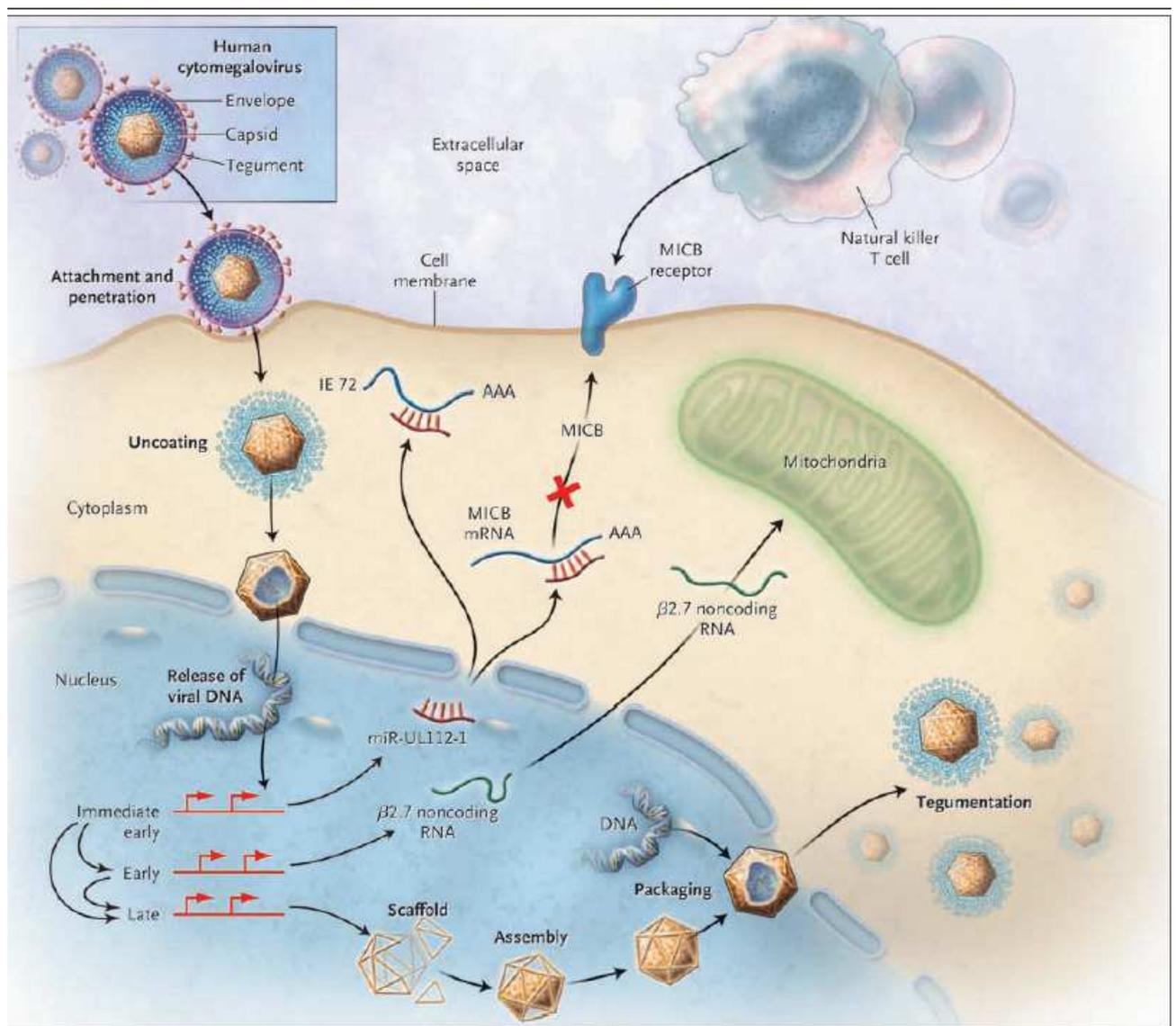
Il Cytomegalovirus è un virus a DNA appartenente alla famiglia degli Herpesviridae. E' costituito da una singola macromolecola di DNA a doppia elica lineare con un genoma di 240 Kb racchiuso in una matrice proteica ed uno strato amorfo ( definiti rispettivamente capside e tegumento), circondato da un doppio strato lipidico contenente i complessi glicoproteici virali definito pericapside (vedi fig 1).

L'organizzazione generale del DNA, simile a quella degli altri Herpesvirus, è caratterizzata dalla presenza di 2 segmenti unici, uno lungo (singola sequenza lunga) ed uno molto più corto (singola sequenza corta). Ogni segmento è delimitato da brevi sequenze ripetute definite sequenze ripetute terminali (TR) e sequenze ripetute invertite (IR).



**Fig. 1** Struttura tridimensionale del Citomegalovirus umano

Immediatamente dopo il contatto con l'agente virale le proteine cellulari dell'ospite, interagendo con le proteine virali di superficie, innescano una prima ondata di produzione di citochine che nella fase precoce è tipicamente pro-infiammatoria ( IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN  $\alpha/\beta$ , iFN $\gamma$ ) (vedi fig. 2) .



**Fig. 2** Meccanismi di interazione con le cellule infettate.

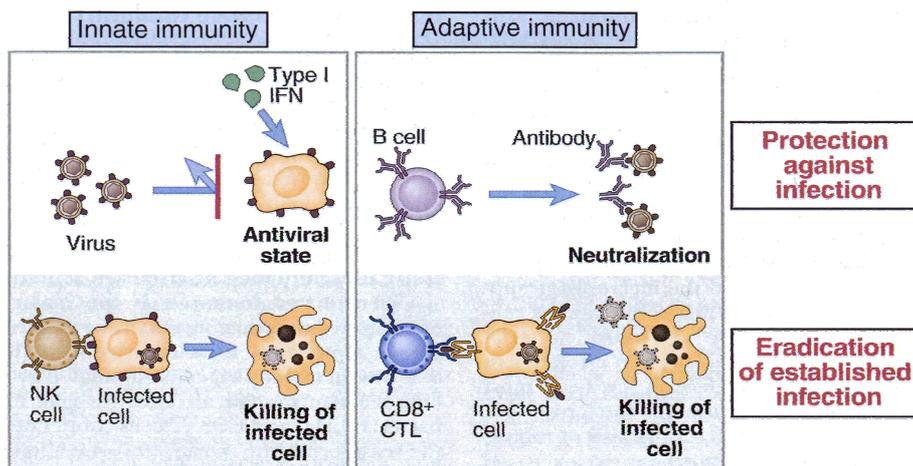
Come gli altri membri della famiglia ha la capacità di rimanere allo stato latente, integrato nel cromosoma delle cellule ospiti, mantenendo una persistente replicazione resa evidente dall'effetto citopatico indotto nella cellula ospite.

La riattivazione di un'infezione latente può aversi in situazioni in cui si determina un rilascio di catecolamine, come uno stress immune, responsabile dell'attivazione di una cascata di citochine e di percorsi di traduzione del segnale che alla fine portano all'attivazione di fattori di trascrizione; il promoter del gene precoce viene trascritto innescando la replicazione virale che procede velocemente attraverso la trascrizione di tre differenti classi di mRNA: immediate-early (IE), early (E), and late (L). Il processo avviene in modo ordinato e sequenziale in modo che ogni fase eserciti un controllo sulla progressione della fase successiva.

La regolazione di tale trascrizione permette al virus di replicarsi velocemente ed ha implicazioni sulla patogenicità del virus e sulla persistenza nello stato di latenza.

L'immunità dell'ospite reagisce attivando una risposta (vedi fig.3) sia innata, attraverso le cellule natural killer (NK), che adattativa mediante le cellule T CD4+,

CD8+, e cellule B, con l'obiettivo di bloccare l'infezione e la disseminazione virale, eliminando le cellule infettate. La risposta B cellulare al virus è preferenzialmente rappresentata da anticorpi neutralizzanti diretti verso la glicoproteina B di membrana, la risposta T cellulare citotossica CD8+ è quasi esclusivamente diretta verso la proteina strutturale pp65 (UL83) .



**Fig. 3** Risposta immune innata ed adattativa

Il ruolo cruciale rivestito dalle cellule NK nel controllo dell'infezione del virus è responsabile dei meccanismi di evasione immune sviluppati dal virus, dei quali il CMV è il prototipo.

Il CMV ha infatti elaborato una serie di meccanismi, di seguito elencati, allo scopo di sfuggire alla clearance da parte dell'ospite mantenendo un'infezione latente:

- Sottoregolazione di molecole di MHC di classe I e II
- Inibizione della risposta T/NK cellulare
- Produzione di proteine omologhe di :
  - citochine immunosoppressive
  - chemochine responsabili della disseminazione virale
  - proteine antiapoptotiche.
  - proteine regolatrici di proliferazione cellulare

Il CMV è largamente diffuso nella popolazione generale, responsabile di una sindrome simil-influenzale pauci-sintomatica, con una prevalenza di infezione di circa il 70%-80%. Nei pazienti immunocompromessi, trapiantati d'organo o con Sindrome da Immunodeficienza Acquisita, il CMV si comporta come patogeno opportunisto, causa di coinvolgimento multiorgano e di elevata mortalità. Nei pazienti sottoposti a trapianto d'organo, il fattore di rischio maggiore di contrarre

l'infezione è legata al ricevimento di un organo, in un paziente sierologicamente negativo, da parte di un donatore CMV positivo. In caso di trapianto di midollo osseo, la polmonite è la manifestazione più severa di infezione da CMV con una mortalità del 60-80% senza trattamento antivirale e del 50% in caso di trattamento con Ganciclovir.

Nei primi anni '90 l'incidenza della retinite ( caratterizzata da necrosi retinale emorragica) da CMV era di 7.5 casi/100 persone-anno tra i pazienti con AIDS mentre l'incidenza di altre infezioni sintomatiche era di 4.5 casi/100 persone-anno; il colon è la seconda sede di infezione dopo la retina. Altre manifestazioni di malattia CMV-associata includono encefalopatia e poli-radicolopatia dovuta alla localizzazione del virus nel sistema nervoso centrale dell'ospite.

Nei pazienti immunocompromessi per cause diverse, neoplasie o malattie autoimmuni, la sieroprevalenza è compresa tra il 40-100%. La presentazione clinica può essere una sindrome mononucleosi-simile nel 25% dei casi mentre più raro è il coinvolgimento multiorgano. L'interessamento gastrointestinale in corso di infezione

da CMV viene descritto in circa il 5% dei pazienti sottoposti a trapianto d'organo e può coinvolgere ogni tratto dell'apparato gastrointestinale.

L'introduzione dei test diagnostici su base molecolare ha permesso di intervenire precocemente sul corso dell'infezione ottenendo un outcome migliore in termini di sopravvivenza.

La strategia terapeutica utilizzata nei pazienti trapiantati si divide in “profilassi” e “terapia preventiva”. La prima consiste nella somministrazione di farmaci antivirali subito dopo il trapianto nei pazienti ad alto rischio ( paziente ricevente CMV- / donatore CMV + ; pazienti che ricevono terapia con anticorpi verso recettori T-cellulari).

La seconda si basa sulla somministrazione di farmaci antivirali nel momento in cui vi è evidenza di replicazione virale (riscontrata precocemente dalle attuali tecniche di biologia molecolare) in modo da impedire il successivo sviluppo di una malattia da CMV. Tuttavia non esistendo in letteratura prove solide di efficacia tale da privilegiare una strategia verso l'altra, la scelta tra terapia preventiva e profilassi è attualmente valutata in base al singolo caso ed al singolo centro.

## L'evidenza di letteratura

I dati di prevalenza di infezione da CMV nei pazienti con MICI sono vari in relazione alla selezione dei pazienti utilizzati nelle diverse casistiche ed ai differenti metodi diagnostici utilizzati. I valori di prevalenza disponibili in letteratura variano dallo 0% al 36%, valutando l'infezione tramite metodiche tradizionali e su casistiche di pazienti con colite attiva soprattutto steroido-resistenti ( vedi tab. 1 e 2),

<b>Autore/anno</b>	<b>Metodo diagnosi</b>	<b>Prevalenza</b>
Cottone/AmJ Gastroenterol 2001	Antigenemia Istologia	36% (7/19 SR)
Wada/ Dis Colon Rectum 2003	Antigenemia	34% (16/47)
Criscuoli/DigLiver Dis 2004	Antigenemia Istologia	21% (9/42)
Kishore/JMed Microbiol2004	Sierologia- Istologia PCR-DNA	16% (10/63)
DeSaussure/Aliment Pharmacol Ther 2004	Viremia coltura sangue/urine	6% (4/64)

**Tabella 1.** Prevalenza su serie di pazienti con colite attiva  
PCR: reazione polimerasica a catena ICH: immunoistochimica

<b>Autore/Rivista anno</b>	<b>Metodo di diagnosi</b>	<b>Prevalenza</b>
Swarbrick/Lancet 1979	istologia	0% ( 0/5)
Cooper/Gastroenterology1977	H&E	13% (6/46) 5 MT
Eyre-Brook/Gut 1986	ICH. Microscopia elettronica	11.5% (3/26)
Kaufman/Dis colon rectum1999	H&E	4.6% (8/172)
Alcalà/Medicina clinica 2000	H&E + ICH	18% (7/39)
Maconi/ Dig Liver Dis 2005	H&E + ICH	22%(17/77>6MT) 27% (15/55 sr)
Kambham/ Am J Surg Pathol 2004	H&E + ICH	24% (6/25 operati) 25% (10/40 sr)
Takahashi/ Dis Colon Rectum 2004	H&E + ICH	21% (8/39)

**Tabella 2.** Prevalenza in pazienti operati

Sr: steroido-resistenti MT: megacolon tossico H&E: colorazione ematossilina-eosina

ICH: immunoistochimica

Autore/anno	Metodo diagnosi	Prevalenza
Wakefield/ JMedVirol 1992	PCR x CMV DNA su biopsie colon	81% (17/21)
Rahbar/ Inflamm Bowel Dis 2003	Ibridizzazione in situ x CMV-DNA	92% (12/13) SD
Dimitroulia/ Inflamm Bowel Dis 2006	Istologia PCR sangue e tessuto	12.6 % (7/58) 34% (20/58)

**Tab. 3** Frequenza di cellule intestinali infettate dal virus  
SD: steroide-dipendenti

mentre raggiungono dati di prevalenza anche superiori al 98% in studi che hanno utilizzato metodiche di biologia molecolare (tabella 3) e su casistiche di pazienti con malattia infiammatoria intestinale anche non attiva.

Rahbar (15) ha valutato la prevalenza del virus su biopsie intestinali in pazienti con malattia infiammatoria intestinale utilizzando tecniche di immunoistochimica e ibridizzazione *in situ* evidenziando una positività del 90% nei pazienti con colite ulcerosa e del 100% in pazienti con malattia di Crohn. L'autore conclude che

l'infezione da CMV in sede intestinale è frequente e può contribuire ai processi infiammatori attraverso un'aumentata produzione di Il-6. Wakefield (16), utilizzando tecniche di PCR su biopsie intestinali di 50 pazienti con MICI ( 29 malattia di Crohn – 21 colite ulcerosa), ha riscontrato un dato di prevalenza rispettivamente del 66% e dell'81% verso il 29% dei controlli. Non sono riportati dati sulla storia naturale dell'infezione da CMV: non è ben noto se, una volta risolto l'attacco acuto, il virus mantenuto in uno stato di latenza negli enterociti, può essere responsabile di ricadute successive soprattutto in situazione di immunosoppressione.

## **Diagnosi di laboratorio**

Le varie metodiche utilizzabili per rilevare l'infezione da CMV mirano ad individuare la presenza del virus o di sue componenti (quali proteine o acido nucleico) nel sangue o nei tessuti, oppure a ricercare la presenza di antigeni specifici.

- La determinazione sierologica degli anticorpi anti- CMV permette di individuare un contatto immunologico intercorso tra l'ospite ed il virus senza chiarire il reale stato di replicazione del virus. Il riscontro di immunoglobuline di classe M, notoriamente indicatori di infezione recente, assume significati diversi nelle varie categorie di soggetti e richiede test complementari per datare l'infezione. Per esempio un incremento delle IgG superiore a 4 volte il valore di base è considerato parimenti alle IgM un marker di infezione recente, ancora più sensibile tramite la misurazione dell'IgG avidità ( avidity index) (17).

La ricerca del virus e delle sue componenti rappresenta il marker più sicuro di infezione. L'analisi istologica si basa sulla ricerca delle inclusioni intranucleari basofile contenute nelle tipiche cellule giganti infettate dal virus su biopsie tissutali,

utilizzando la colorazione con ematossilina-eosina (E&O) ed eventualmente confermata mediante tecniche di immunistochemica (ICH).

Altre tecniche di uso meno comune sono rappresentate da:

- Visualizzazione diretta con tecniche di microscopia elettronica
- Coltura cellulare a 10 giorni su fibroblasti umani per evidenziare l'effetto citopatico
- Coltura cellulare a 5 giorni utilizzando un anticorpo verso un antigene precoce
- Coltura rapida a 24 ore utilizzando un anticorpo verso un antigene precocissimo

Nei pazienti immunocompromessi, sono necessarie tecniche molto sensibili per la diagnosi precoce di infezione: l'antigenemia e la ricerca del CMV- DNA sono i metodi di scelta per un rapido isolamento del virus.

L'antigenemia è un metodo immuno-citochimico basato sulla ricerca della proteina precoce di struttura pp65, considerata marker di replicazione virale, direttamente nel nucleo dei polimorfonucleati isolati su sangue periferico tramite un citocentrifugato e successiva incubazione con anticorpo monoclonale diretto verso la proteina pp65.

Le cellule positive vengono visualizzate mediante microscopio a fluorescenza ed il

risultato viene espresso in numero di cellule fluorescenti x 200.000 PMN.

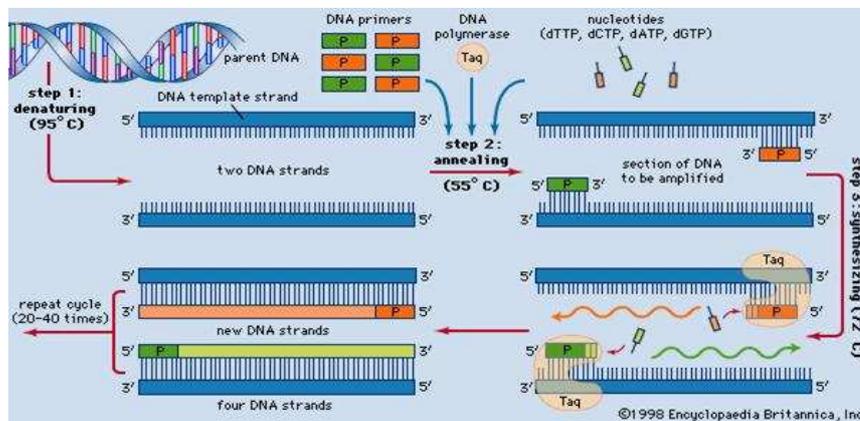
E' un test rapido ed accurato che permette di identificare e quantificare la carica virale precocemente .

Negli ultimi 10 anni le tecniche di biologia molecolare come la PCR (reazione polimerasica a catena) sono diventate insostituibili nella diagnostica di laboratorio per l'abilità ad identificare anche minime quantità di acido nucleico virale su differenti campioni clinici.

La PCR (18) è una reazione di amplificazione in vitro di un segmento specifico di DNA tramite una DNA-polimerasi che, a partire da un primer, amplifica con repliche successive la sequenza desiderata. Nella reazione sono coinvolti 3 segmenti di acidi nucleici: lo stampo di DNA a doppia elica che deve essere amplificato e 2 primers oligonucleotidici a singolo filamento che fiancheggiano il segmento stampo. I primers ibridano con i filamenti opposti del DNA stampo e sono orientati con le loro estremità 3' una di fronte all'altra in modo che la sintesi da parte delle DNA-polimerasi si estenda lungo il segmento di DNA tra loro interposto.

Bisogna quindi scegliere frammenti oligonucleotidici sintetici ( primers) capaci di ibridarsi ai loro filamenti complementari e di realizzare le replicazioni che assicureranno l'amplificazione della sequenza contenuta tra i primers. E' dunque necessario conoscere prima, almeno in parte, la sequenza che si desidera amplificare.

La PCR si articola in tre fasi ( vedi fig. 4) :



**Fig. 4** Schema di reazione polimerasica a catena

- 1) denaturazione del DNA stampo
- 2) ibridazione dei primers al DNA stampo
- 3) estensione dei primers

Quest'ultima tecnica riveste una particolare importanza e presenta diversi aspetti

favorevoli:

- è specifica perché è una reazione di ibridazione. Una particolare sequenza nota del virus è riconosciuta e quindi segnalata da un elemento sonda (primer) ad esso complementare.

- è sensibile perché anche utilizzando quantità molto ridotte del campione in esame si ha la possibilità di rilevare quantità ridottissime di DNA virale.

- è rapida ottenendo una risposta nell'arco di 24-48 h.

- è versatile perché virtualmente l'analisi può essere condotta su ogni tipo di campione.

La Nested-PCR è una metodica che serve per aumentare la specificità e la sensibilità della reazione di PCR.

Vengono utilizzate 2 coppie di primers: il frammento di DNA amplificato nella prima PCR con la coppia di primers più esterni viene ulteriormente amplificato con una coppia di primers che fiancheggiano una sequenza interna al segmento bersaglio della prima reazione. I limiti della tecnica sono legati al rischio di contaminazione.

La più recente tecnica quantitativa viene usata per determinare quantità di DNA in

seguito a tecniche di amplificazione e sembra rivestire un ruolo importante per il fatto che pazienti con alti livelli di CMV-DNA hanno una malattia attiva e che l'incremento della carica virale si correla con i sintomi. E' evidente che la carica virale è un fattore centrale nella patogenesi di molte infezioni virali e nella gestione dei pazienti con infezione, soprattutto in trattamento antivirale (19,20).

### **Premessa allo studio**

Il nostro gruppo ha negli anni sviluppato un crescente interesse riguardo l'associazione tra il CMV e le malattie infiammatorie intestinali, ampliando un campo di ricerca che si è evoluto negli anni.

I primi studi effettuati nel 2000 nascevano dall'osservazione di casi di colite (ulcerosa o di Crohn) moderata-severa resistenti al trattamento steroideo nei quali era stata osservata la presenza del virus in biopsie rettali.

Il primo studio (21) prospettico, condotto su 62 pazienti ( 55 con rettocolite ulcerosa e 7 con malattia di Crohn) ricoverati dal 1997 al 1999 per riattivazione della colite presso la Divisione di Medicina I dell'Ospedale V. Cervello di Palermo, aveva per

obiettivo la valutazione della prevalenza e dell'outcome dell'infezione da CMV in una serie consecutiva di pazienti con colite ulcerosa severa refrattaria al trattamento steroideo. In totale 19 pazienti sono stati studiati mediante istologia tradizionale sui campioni biotici ottenuti in corso di biopsia rettale, fissati e colorati con Ematossilina- Eosina. La presenza del virus, sostenuta dal riscontro di grandi cellule atipiche con inclusioni eosinofile e basofile, è stata confermata dall'Immunostochimica per la ricerca delle proteine virali. Sugli stessi pazienti il virus era stato inoltre cercato nel circolo su leucociti periferici mediante antigenemia con anticorpi monoclonali fluoresceinati anti pp65 (su citocentrifugato di leucociti periferici metodo Buffy Coat). Il dato di prevalenza ottenuto è stato del 36%. Sette su diciannove pazienti resistenti al trattamento steroideo, sono risultati positivi sia per il riscontro istologico di inclusioni nucleari nelle biopsie rettale sia per la positività all'antigenemia su leucociti periferici.

La possibilità che il virus non fosse sempre responsabile di resistenza al trattamento steroideo utilizzato per la riacutizzazione della malattia infiammatoria ha motivato il secondo studio prospettico e la ricerca che costituisce l'oggetto della tesi.

## **Pazienti e metodi**

### **I studio**

Sono stati inclusi nello studio i pazienti ricoverati dal 2000 al 2003 presso la Divisione di Medicina I dell'Ospedale V. Cervello di Palermo per un episodio di riattivazione moderata-severa della colite. I pazienti sono stati studiati al momento del ricovero senza attendere l'eventuale non risposta al trattamento steroideo in modo da identificare un valore di prevalenza indipendente dalla steroido-resistenza.

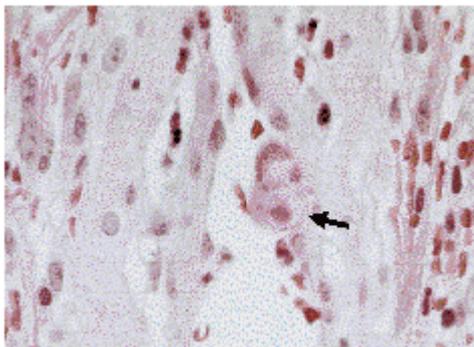
La I serie è composta da 39 pazienti (35 rettocolite ulcerosa - 4 malattia di Crohn), nei quali il virus veniva cercato con istologia tradizionale su biopsie rettali e con antigenemia pp65. Le biopsie rettali sono state ottenute in corso di rettoscopia esplorativa con minima insufflazione d'aria, eseguita entro 48 ore dal momento del ricovero.

Le biopsie venivano immediatamente fissate in formalina neutra tamponata al 10%, per 2-3 ore circa, in modo da ottenere un'adeguata fissazione che comunque non interferisse con l'esecuzione delle successive metodiche. Il preparato in seguito veniva sottoposto ai passaggi (lavaggio, disidratazione, diafanizzazione,

impregnazione in paraffina, inclusione) atti all'allestimento delle sezioni di spessore di 3-4  $\mu$  e successivamente le sezioni venivano trattate con la colorazione E&O.

L'esame istologico, oltre a documentare la fase di attività della malattia, permette la ricerca della presenza di cellule citomegaliche, espressione di infezione da parte del virus.

Le cellule citomegaliche sono 2-4 volte più grandi delle cellule circostanti ( 25 -35  $\mu$  ) e contengono delle inclusioni intranucleari basofile (8-10  $\mu$ ), situate eccentricamente e circondate da un alone chiaro che danno alla cellula un aspetto denominato "owl's eye" (occhio di civetta Fig. 5); la membrana nucleare può essere



**Fig. 5** Aspetto ad "occhio di civetta"

ispessita e frequentemente si associa a più piccole inclusioni granulari intracitoplasmatiche.

Il riscontro morfologico veniva confermato attraverso una particolare tecnica di immunistochemica che utilizza anticorpi coniugati con polimeri ed eseguendo le varie tappe del procedimento immunistochemico attraverso lo strumento Bond Max per la ricerca delle proteine virali.

Per rilevare il valore dell' antigenemia è stato utilizzato il metodo CMV- CINAKit (Argene® Biosoft) su leucociti polimorfonucleati estratti da sangue periferico ed incubati con anticorpi monoclonali anti pp65. Il risultato è stato espresso per numero di nuclei fluorescenti / $2 \times 10^5$  leucociti. Un risultato superiore a 4 cellule positive è stato considerato espressione di infezione; tra 1 e 4 cellule positive il prelievo veniva ripetuto dopo 48 ore per eventualmente evidenziare un incremento del numero dei nuclei positivi. Il paziente veniva considerato positivo per infezione in caso di riscontro istologico di inclusioni virali, mentre la presenza di entrambi i test positivi (istologia ed antigenemia) era considerato un criterio di trattamento con terapia antivirale. La decisione relativa all'inizio della terapia con Ganciclovir veniva tuttavia correlata all'attività di malattia ed alla risposta al trattamento per la sottostante malattia infiammatoria.

Dal 2003 ad oggi tutti i pazienti ricoverati per un episodio di riattivazione di colite

moderata- severa vengono sottoposti a screening per la ricerca del virus.

Come sottolineato in precedenza, la difficile interpretazione dei dati della letteratura sulla prevalenza del virus nasce dalle differenze nelle tecniche diagnostiche utilizzate per la diagnosi dell'infezione virale, fornendo erroneamente delle sottostime; per conoscere il reale dato di prevalenza bisogna utilizzare una metodica d'indagine più sensibile.

In considerazione dei risultati ottenuti e discussi in seguito, l'obiettivo successivo della ricerca è stato quindi quello di valutare la prevalenza, l'eventuale influenza sul decorso di malattia e la storia naturale dell'infezione da Cytomegalovirus, in una serie di pazienti con MICI riattivata, utilizzando una metodica più sensibile (la nested PCR su tessuto) rispetto a quella utilizzata in precedenza.

## **II studio**

Dal 2003 al 2007 sessantotto pazienti, ricoverati per un episodio di riattivazione moderata-severa di colite ulcerosa presso la Divisione di Medicina I dell'Ospedale V. Cervello di Palermo, sono stati studiati per la ricerca del CMV al momento del

ricovero. I pazienti sono stati sottoposti a biopsia rettale senza insufflazione d'aria allo scopo di valutare l'attività di malattia ed ottenere i campioni biotici.

I preparati istologici, opportunamente preparati e fissati sono stati colorati ed esaminati con:

- a) Ematossilina-Eosina per evidenziare il dato morfologico e gli aspetti descritti in precedenza
- b) la tecnica di immunistochimica
- c) nested-PCR per evidenziare la presenza di CMV-DNA.

Quest'ultima è stata eseguita utilizzando "internal" ed "external" primers specifici per la glicoproteina B di membrana (UL 56) del Cytomegalovirus al fine di ottenere una valutazione qualitativa del virus. I pazienti sono stati inoltre sottoposti a prelievo di sangue periferico per la ricerca dell'antigenemia pp65 su leucociti periferici secondo la metodica utilizzata nella serie precedente.

I pazienti risultati positivi sono stati seguiti clinicamente con cadenza trimestrale in sede ambulatoriale allo scopo di valutare la durata del tempo di remissione, il numero

di recidive, l'uso di trattamenti immunomodulanti, il ricorso alla chirurgia. Sono stati inoltre sottoposti ad un follow-up endoscopico ogni 1-2 anni ( in base alla durata di malattia) in modo da seguire la storia naturale dell'infezione da Cytomegalovirus dal punto di vista della persistenza istologica, per meglio comprendere il suo eventuale ruolo di "osservatore" o predisponente la riattivazione di malattia.

## **Risultati**

### **I studio**

Nella prima serie di 39 pazienti, nei quali il virus veniva ricercato al momento del ricovero con E&O, ICH ed antigenemia, il CMV è stato riscontrato in 9 pazienti: in 3 sia nel sangue periferico che nelle biopsie rettali, in 4 solo nelle biopsie, in 2 solo nel sangue periferico, ottenendo quindi un dato di prevalenza del 21% (22).

Tra i tre pazienti positivi sia su leucociti periferici che su biopsie rettali due sono risultati steroideo-resistenti. Due sono stati trattati con terapia antivirale (Ganciclovir) ottenendo la remissione clinica in entrambi; il terzo paziente, non essendo ancora

disponibili i risultati di positività del CMV, è stato trattato con ciclosporina e.v ottenendo la remissione nonostante il successivo riscontro di positività dell'antigenemia e della biopsia. Tra i quattro pazienti con positività istologica due sono risultati steroideo-resistenti e sono stati trattati con terapia antivirale ottenendo remissione in un paziente mentre colui che non ha risposto è stato sottoposto ad intervento chirurgico per la severa attività di malattia. I 2 pazienti con positività nel sangue periferico sono andati incontro a remissione con terapia convenzionale. In totale 4 su 9 pazienti CMV+ sono risultati steroideo-resistenti (44%); di questi due sono andati incontro a remissione con terapia antivirale, uno con ciclosporina mentre un paziente è stato sottoposto a colectomia. Tra i 30 pazienti negativi per il CMV sette sono risultati steroideo-resistenti (23%).

## **II studio**

Tra i 68 pazienti studiati dal 2003 al 2007, 28 sono risultati positivi alla ricerca istologica del virus ottenendo un dato di prevalenza del 41% (vedi tab 4). In dettaglio 23 pazienti sono risultati positivi all'istologia tradizionale e confermati tramite PCR,

ulteriori cinque casi sospetti per il dato morfologico e all'immunoistochimica sono stati confermati con la ricerca del DNA virale tramite nested-PCR. Dieci pazienti sul totale dei 28, sono risultati positivi anche alla ricerca dell'antigenemia pp65 (35%).

Tra i 10 pazienti positivi sia all'istologia che all'antigenemia 7 sono stati trattati con terapia antivirale con Ganciclovir per steroideo-resistenza ottenendo la remissione in 5 pazienti. Un paziente è stato operato per la comparsa di megacolon tossico ed è deceduto nel post-operatorio; un altro è stato operato per non risposta. Tre pazienti non sono stati trattati con antivirale perché andati in remissione con la terapia per la sottostante malattia infiammatoria intestinale: uno trattato con ciclosporina e.v (2 mg/kg/die) e due con terapia steroidea e.v (1mg/kg die). Quindici sui diciotto pazienti positivi all'istologia ma negativi all'antigenemia su leucociti periferici sono andati incontro a remissione con terapia convenzionale. Un paziente è stato trattato con terapia antivirale ed operato di colectomia per non risposta e peggioramento clinico, altri due pazienti sono stati operati per rapido peggioramento clinico. In totale tra i 28 pazienti risultati positivi per il Cytomegalovirus 5 sono stati sottoposti ad

intervento chirurgico di colectomia (18%) e di questi, tre sono stati trattati con terapia antivirale. Tra i 40 pazienti risultati negativi alla ricerca del virus solo 2 pazienti sono stati sottoposti ad intervento (5%).

Tra i 28 pazienti risultati positivi al virus, dodici erano in trattamento immunosoppressivo.

<b>Pazienti totali</b>	<b>CMV+ istologia E&amp;O/PCR</b>	<b>CMV+ istologia Antigenemia pp65</b>	<b>CMV-</b>
68	23/28	10 (10/28)	40

**Tab. 4** Risultati II studio

Quaranta pazienti sono risultati negativi sia alla ricerca istologica del virus sia all'antigenemia.

<b>n.pazienti positivi al CMV</b>	<b>Immunos.</b>	<b>Remissione</b>	<b>Intervento</b>	<b>Persi al follow-up</b>	<b>CMV DNA + al follow-up</b>
28	12	23	5	5	8
<b>n.pazienti negativi al CMV</b>					
40	13	38	2	----	----

**Tab. 5** Decorso clinico

Tra i 28 pazienti positivi, 23 sono andati in remissione clinica con trattamento

medico e sono stati seguiti con un follow-up medio di 46 mesi, sia clinicamente che endoscopicamente secondo il metodo descritto in precedenza. Tutti i pazienti sono risultati negativi alla ricerca del virus mediante istologia tradizionale con E&O ed ICH, mentre otto sono risultati positivi alla ricerca del DNA virale tramite nested PCR eseguita sugli stessi campioni istologici (vedi tab. 6).

Tra gli otto pazienti nei quali è stata riscontrata la presenza del DNA virale nelle biopsie intestinali eseguite durante i controlli endoscopici di follow-up, quattro sono andati incontro ad un episodio di riattivazione: un paziente è andato in remissione con terapia steroidea; due pazienti sono diventati steroideo-dipendenti e sono stati trattati con Infliximab ottenendo entrambi la remissione. Il quarto paziente, steroideo-dipendente, intollerante ad Azatioprina con controindicazione all'Infliximab, per la severa attività di malattia è stato sottoposto a colectomia. Un paziente tra gli otto positivi al CMV-DNA è stato trattato prima con leuco-afèresi e poi con Infliximab per steroideo-dipendenza.

N. paziente	Malattia	Anno diagnosi	Riattivazione	Terapia di mantenimento	Stato malattia > esito
1	Rcu sinistra	2003	No	Azatioprina	R
2	Rcu subtotale	2001	Si > severa IFX	Infliximab	R
3	Rcu sinistra	1998	Si > severa	Steroido-dipendente	C
4	Rcu sinistra	2003	Si > severa IFX Genotipo GN 4B	Infliximab	R K prostata
5	Rcu sinistra	2002	No Genotipo GN 3A	Leuko-aferesi Infliximab	R
6	Rcu sinistra	1993	Si > moderata steroide	5-asa	R
7	Rcu subtotale	1999	No	5-asa	R
8	Rcu sinistra	2005	No	Azatioprina	R

**Tab. 6** Caratteristiche dei pazienti positivi alla PCR per CMV-Dna al follow-up  
R: remissione C: colectomia IFX: Infliximab K: carcinoma

I tre pazienti trattati con Infliximab ( ed uno anche con aferesi leucocitaria) per attività di malattia e resistenza al trattamento convenzionale, dopo il periodo di induzione, sono stati sottoposti ad endoscopia di controllo per valutare l'attività di malattia e l'eventuale diffusione virale. All'esame istologico di controllo si è tuttavia assistito alla scomparsa del virus nelle biopsie intestinali, valutata mediante E&O e ICH ma con persistenza del virus evidenziata alla nested- PCR.

Tra i quindici pazienti con CMV- al follow-up, cinque sono andati incontro ad un episodio di riattivazione e sono andati in remissione con terapia medica.

## **Discussione**

Il legame esistente tra il CMV e le malattie infiammatorie intestinali è probabilmente stretto ma non ancora del tutto chiarito. L'interazione con il sistema immune dell'ospite gioca sicuramente un ruolo chiave nello sviluppo successivo di infezione o malattia ed è qui che deve essere ricercata la patogenicità del virus.

Secondo la definizione data da Ljungman (23) di "malattia gastrointestinale (GI) da CMV" vi devono essere i sintomi di interessamento GI associati al riscontro istologico del virus. Tuttavia nella nostra popolazione l'evidenza istologica del virus, forse memoria di una infezione pregressa, non è risultata sempre predittiva di decorso sfavorevole o di resistenza al trattamento. L'insieme della positività dell'antigenemia sui leucociti periferici associata al riscontro istologico del virus, potrebbe invece significare un ruolo da cofattore svolto dal CMV forse favorente la riattivazione

della colite. Il riscontro del virus in corso di riattivazione di colite sembra associata più frequentemente alla steroido-resistenza ( 44% vs 23%) ed al ricorso alla chirurgia (18% vs 5%); tuttavia vi sono stati dei pazienti nei quali si è ottenuta la remissione anche dopo trattamento immunosoppressivo. L'immunodepressione indotta dalla stessa malattia infiammatoria o dai farmaci utilizzati per il mantenimento della remissione può influire sulla riattivazione del virus la cui virulenza e manifestazioni cliniche sono variabili; dall'altro lato la riduzione dell'attività infiammatoria locale, ottenuta dopo trattamento della colite, può creare un substrato sfavorevole la replicazione virale che è sostenuta da citochine pro-infiammatorie.

Rimane ancora non chiaro se la quantizzazione della carica virale sistemica possa essere utilizzata per predire il successivo sviluppo di malattia prima della comparsa dei sintomi: qual è il tempo di comparsa della carica virale rispetto ai sintomi?

E' noto che pazienti con "malattia sintomatica" hanno una carica virale sistemica più alta rispetto ai pazienti asintomatici. Esiste una soglia oltre la quale vi è indicazione ad iniziare un trattamento ?

Il CMV è stato ampiamente studiato nei pazienti immunodepressi.

I dati provenienti dalla letteratura (24) derivano da studi effettuati tramite PCR quantitativa su differenti classi di pazienti ( sottoposti a trapianto d'organo o con sindrome da immunodeficienza acquisita) ed hanno individuato una probabile soglia predittiva di malattia:

1. in pazienti HIV positivi una soglia di  $> 100$  copie di DNA x  $\mu\text{l}$  di plasma risulta altamente predittiva di malattia.
2. in pazienti trapiantati di midollo:  $10^4$  copie di DNA x ml di sangue intero.
3. in pazienti trapiantati di rene:-  $> 500$  copie di DNA x  $\mu\text{g}$  di DNA totale.  
-  $> 10^6$  copie di DNA per ml di urine.

Vi sono alcune osservazioni da fare:

- si assiste ad un declino della carica virale sistemica dopo l'inizio della terapia antivirale: ciò consente di valutare un'eventuale risposta al trattamento e seguirla nel tempo.

- le mutazioni del gene UL 97 sono state riscontrate nel 30% dei pazienti che ricevono Ganciclovir per un periodo superiore a tre mesi. L'insorgenza di resistenza è causa di incremento della carica virale. La resistenza è legata ad un'alterazione del gene UL97 il cui prodotto proteico è responsabile della fosforilazione del ganciclovir, meccanismo attraverso il quale il farmaco antivirale inibisce la Dna polimerasi e quindi la replicazione virale.

- mancano studi randomizzati e controllati che rendano valido il concetto di utilizzare la carica virale nella strategia pre-trattamento.

- occorre valutare su differenti popolazioni il rapporto costo-beneficio e la tossicità dell'uso della terapia antivirale come terapia preventiva in pazienti ad alto rischio.

Uno studio prospettico di confronto tra PCR quantitativa su plasma ed antigenemia in pazienti trapiantati di midollo osseo (25,26) ha messo in evidenza la maggiore sensibilità della tecnica PCR nell'identificare la presenza del virus rispetto all'antigenemia, ma un uguale efficacia ed un ruolo probabilmente complementare.

Schröder (27) ha stabilito un cut-off del valore di antigenemia in pazienti trapiantati di rene in base al quale diagnosticare la malattia oppure iniziare la terapia antivirale:

---

4 cell x 10 <sup>5</sup> PMN	per diagnosticare la malattia da CMV
10 cell x 10 <sup>5</sup> PMN	per iniziare la terapia antivirale

---

PMN: polimorfonucleati

La PCR fecale (28) è considerata utile nella localizzazione gastrointestinale del CMV in pazienti ad alto rischio e si rivela utile nella distinzione con la Graft versus host disease gastrointestinale.

Ad oggi la PCR qualitativa real time è più sensibile dell'antigenemia nell'individuare la riattivazione del CMV, ma con un costo più elevato che non si riproduce in un guadagno clinico .

Yakushiji (26) ha correlato il numero delle cellule positive per l'Ag pp65 ed il livello del CMV DNA plasmatico. Il riscontro di 1 cellula positiva si correla con 2 x 10<sup>2</sup> CMV DNA copie/ml ed è considerato un risultato positivo.

Il test dell'antigenemia ha mostrato i seguenti valori 55.4%/95.5%/88.9%/76.9% rispettivamente per sensibilità/specificità/valore predittivo positivo/valore predittivo negativo, usando la real-time PCR come riferimento.

Vi sono alcune osservazioni da fare sugli otto pazienti nei quali è stata riscontrata una positività del CMV DNA alla PCR su biopsie intestinali.

- 1) La scomparsa del virus dopo trattamento con anti-TNF può trovare una potenziale spiegazione nell'interazione che si stabilisce tra il virus ed il sistema immune dell'ospite. Studi sperimentali hanno dimostrato come il TNF $\alpha$  possieda la capacità di incrementare la produzione di CMV attraverso l'attivazione del "major immediate early promoter", che regola la cascata trascrizionale dei geni necessari alla replicazione virale (29).

Un'interruzione della sequenza replicativa può indurre il virus in uno stato latente nelle cellule infettate. Viene così ipotizzato che l'inibizione del rilascio di TNF- $\alpha$  possa essere una strategia alternativa per prevenire la morbilità CMV associata (30).

- 2) E' possibile che il differente decorso di malattia nei pazienti con permanenza istologica del virus sia da ricondurre a differenti genotipi virali.

I differenti ceppi virali possono variare in termini di virulenza, tropismo e potenziale patogeno. Il CMV è il più grande costituente della famiglia degli Herpesvirus. Ha una sequenza di DNA unica e lineare a doppia elica di circa 240 Kb e codifica per una

serie di open reading frames (ORF) sia strutturali che regolatori le cui funzioni sono associate con l'insorgenza, la progressione dell'infezione e la replicazione.

Tra questi il complesso gC-II, consiste di due glicoproteine chiamate gN e gM altamente immunogeniche e codificate rispettivamente dall'ORF UL 73 e UL 100.

GN è responsabile dell'induzione nell'ospite, di una risposta anticorpale

neutralizzante, suggerendo un ruolo principale nel contatto e nell'interazione di superficie con la cellula ospite.

Per mantenere l'infettività e la sopravvivenza le sequenze di aminoacidi che interagiscono con il recettore delle cellule infettate sono le più conservate.

UL 73 >>gN presenta una regione sede di polimorfismi dove è possibile che avvengano sostituzioni nucleotidiche.

Nella popolazione mondiale esistono 4 principali genotipi gN conosciuti con i rispettivi sottogruppi: gN-1, gN-2, gN-3a, gN-3b, gN-4a, gN-4b, gN-4c.

<b>Genotipo</b>	<b>Frequenza allelica %</b>
gN-1	25.6
gN-2	1.9
gN-3a	8.9
gN-3b	4.3
gN-4a	21.3
gN-4b	12.8
gN-4c	25.2

**Tab. 7** Frequenza allelica e genotipo

La percentuale di aminoacidi che differenziano i diversi ceppi è del 50% (variabilità totale). Il genotipo gN è stato sequenziato (31-32) tramite PCR e Restriction fragment length polymorphism ( RFLP) su 270 ceppi wild-type ottenendo la seguente frequenza genotipica ( vedi Tab. 7).

Le differenze sembrano essere correlate alla variabilità genetica rappresentata da geni chiave. Una sostanziale porzione del genoma virale codifica per proteine che

potenzialmente possono influire sulla virulenza attraverso il meccanismo di evasione immune, interferire con le chemochine dell'ospite o con i meccanismi di attivazione immunologica e riconoscimento antigenico. La virulenza potenziale può inoltre derivare da proteine target per la risposta immune dell'ospite come le glicoproteine di membrana il cui polimorfismo genetico potrebbe essere associato con la variabilità nel controllo dell'infezione virale come nel tropismo. Sebbene gli effetti delle varianti genomiche sulla biologia dell'infezione siano poco conosciute, le variazioni molecolari possono essere d'aiuto nel comprendere l'epidemiologia e la patogenesi del CMV. Per quanto riguarda il polimorfismo gN, gli studi, sia su popolazione immunocompetente che immunocompromessa, suggeriscono che il gN-1 (più frequente nei pazienti con AIDS) potrebbe rappresentare un genotipo meno virulento mentre il gN-4 è associato a manifestazioni più gravi e ad un riscontro più precoce del virus in circolo (valutato mediante antigenemia pp65).

A scopo conoscitivo abbiamo identificato il genotipo virale su 4 degli 8 pazienti con persistenza del genoma virale nel corso del follow-up (vedi tab. 6).

## **Conclusioni**

Sebbene il CMV sia un patogeno noto nelle condizioni di immunodeficienza, negli anni ha assunto una posizione che ha suscitato l'attenzione soprattutto nelle condizioni di infiammazione.

Il legame tra il virus e le malattie infiammatorie intestinali è stato messo in evidenza in letteratura mostrando un'associazione con dati di prevalenza variabili. L'aspetto che ancora non è chiaro è se la presenza del virus nelle biopsie intestinali di pazienti con colite attiva svolga un ruolo di cofattore nel mantenimento dell'infiammazione stessa. Quello che si sa è che il virus, nel momento in cui interagisce con l'ospite scatena un'attivazione di citochine ad azione pro-infiammatoria che probabilmente mantengono o talvolta innescano un'infiammazione persistente. Dal momento che gli stessi mediatori ( per es. TNF o Il-6) sono responsabili del mantenimento della replicazione virale, l'azione dell'anti- TNF potrebbe forse promuovere una più rapida clearance e regolare il bilancio tra latenza e riattivazione dell'infezione da CMV.

Le informazioni che vengono tratte dalla letteratura mostrano che un legame esiste.

E' infatti diventato uso comune, nei centri di riferimento, la ricerca del virus in corso di riattivazione della colite in modo da correlare l'esacerbazione di malattia con la

presenza del virus. La decisione sul trattamento resta tuttavia discrezionale in base all'andamento di malattia. Nuove acquisizioni sul comportamento e sulla patogenicità del virus potranno forse aiutare a comprendere quando trattare la sovrainfezione o quando trattare la malattia e stabilire così una comune linea-guida da adottare in corso di riattivazione di colite CMV-associata.

## **Bibliografia**

1. Fiocchi C. Inflammatory Bowel Disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115:182-205
2. Bouma G, Strober W. The Immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews* 2003; 3: 521-33
3. Campieri M, Gionchetti P Bacteria as the cause of ulcerative colitis. *Gut*. 2001 Jan;48(1):132-5
4. Gionchetti P, Lammers KM, Rizzello F, Campieri M. Probiotics and barrier function in colitis. *Gut*. 2005 Jul;54(7):898-900
5. Mee AS, Jewell DP. Factors inducing relapses in IBD. *Br Med J* 1978;2:6140:801-2
6. Gilat T, Hacoen P, Lilos P. Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1987;22:1009-1024
7. Kangro HO, Chong SKF, Hardiman A et al. A prospective study of viral and mycoplasma infections in chronic inflammatory bowel disease *Gastroenterology* 1990;98:549-553
8. Powell RD, Warner NE, Levine RS, et al. Cytomegalic inclusion disease and ulcerative colitis. Report of a case in a young adult. *Am J Med* 1961; 30:334-40
9. Orvar K, Murray J, Carmen G, et al. Cytomegalovirus infection associated with onset of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 2307-2310
10. Diepersloot RJA, Kroes ACM., Visser W, et al. Acute ulcerative proctocolitis associated with primary cytomegalovirus infection. *Arch Intern Med* 1990;150 :1749-51
11. Yee YK, Wong SW, Szeto ML. Ulcerative colitis exacerbation associated with cytomegalovirus infection. *HKMJ* 1998; 4: 437-439
12. Loftus EV Jr, Alexander GL, Carpenter HA. Cytomegalovirus as an exacerbating factor in ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol* 1994 Dec; 19 (4) :306-9
13. Streetz KL, Buhr T, Wedemeyer H, Bleck J, Schedel I, Manns MP, Göke MN. Acute CMV-colitis in a patient with a history of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 119-122
14. Ioshii SO, Teixeira V, Figueiredo TMS. Megacolon toxico fatal por cytomegalovirus em paciente com retocolite ulcerativa idiopatica: relato de caso e revisao de literatura. *ARQGA* 2002 Vol. 39, No 2: 111-3.

15. Rahbar A, Bostrom L, Lagerstedt U, Magnusson I, Soderberg-Naucler C, Sundqvist VA. Evidence of active cytomegalovirus infection and increased production of IL-6 in tissue specimens obtained from patients with inflammatory bowel diseases. *Infl amm Bowel Dis* 2003; 9: 154-161
16. Wakefield AJ, Fox JD, Sawyerr AM, Taylor JE, Sweenie CH, Smith M, Emery VC, Hudson M, Tedder RS, Pounder RE. Detection of herpesvirus DNA in the large intestine of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease using the nested polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1992; 38: 183-190
17. Grangeot-Keros L, Cointe d. Diagnosis and prognostic markers of HCMV infection *Journal of Clinical Virology* 2001 (21)3: 213-221
18. Olive D.M, Simsek M, Al-Mufti S. Polymerase chain reaction assay for detection of human cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 1989. Vol. 27; 1238-1242.
19. Yoshino T, Nakase I, Ueno S, Uza N, Inoue S, Mikami S, et al. Usefulness of quantitative real-time PCR assay for early detection of cytomegalovirus infection in patients with ulcerative colitis refractory to immunosuppressive therapies. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(12):1516-21
20. C. Deback, A.M. Fillet, N. Dhedin, B. Barrou, S. Varnous, F. Najjioullah, F. Bricaire, H. Agut. Monitoring of human cytomegalovirus infection in immunosuppressed patients using real-time PCR on whole blood. *Journal of Clinical Virology* 2007; 40: 173-9.
21. Cottone M; Pietrosi G; Martorana G, Casa A, Pecoraro G, Oliva L, Orlando A, Rosselli M, Rizzo A, Pagliaro L. Prevalence of cytomegalovirus infection in severe refractory ulcerative and Crohn's colitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 773-775
22. Criscuoli V, Casa A, Orlando A, Pecoraro G, Oliva L, Traina M, Rizzo A, Cottone M. Severe acute colitis associated with CMV: a prevalence study. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 818-820
23. Ljungman P, Plotkin SA. Workshop of CMV disease: definitions, clinical severity scores, and new syndromes. *Scand J Infect Dis Suppl* 1995;99:87-9.
24. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of Cytomegalovirus: Methodologic Aspects and Clinical Applications. *Clin Microbiol Rev*. 1998 (11): 533-554
25. Gentile G, Picardi A, Capobianchi A, Spagnoli A, Cudillo L, Dentamaro T, Tendas A, Capelli L, Ciotti M, Volpi A, Amadori S, Martino P, de Fabritiis P. A prospective study comparing quantitative Cytomegalovirus (CMV) polymerase chain reaction in plasma and pp65 antigenemia assay in monitoring patients after allogeneic stem cell transplantation. *BMC Infectious Diseases* 2006, 6:167
26. Yakushiji I, Gondo H, Kamezaki K, Shigematsu K, et al. Monitoring of cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation: comparison

of an antigenemia assay and quantitative real-time polymerase chain reaction Bone Marrow Transplantation (2002) 29, 599–606.

27. Schröder, T. Michelon, I. Fagundes, A. Bortolotto, E. Lammerhirt, J. Oliveira, A. Santos, A. Bittar, E. Keitel, V. Garcia. Antigenemia for Cytomegalovirus in Renal Transplantation: Choosing a Cutoff For the Diagnosis Criteria in Cytomegalovirus Disease. *Transplant Proc.* 37: 2781-3 .

28. Michel D, Marre E, Hampl W et al. Intestinal cytomegalovirus disease in immunocompromised patients may be ruled out by search for cytomegalovirus DNA in stool samples. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3064–7.

29. Geist LJ, Hopkins HA, Dai LY, He B, Monick MM, Hunninghake GW. Cytomegalovirus modulates transcription factors necessary for the activation of the tumor necrosis factor-alpha promoter. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997 Jan;16:31-7.

30. Fietze E, Prosch S, Reinke P, Stein J, Docke WD, et.al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor. *Transplantation* 1994 27; 58 (6):675-80

31. Pignatelli S, Del Monte P, Rossini G, Landini MP. Genetic polymorphism among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains *Rev Med Virol.* 2004; 14: 383-410

32. Pignatelli S, Rossini G, Dal Monte P, Gatto MR, Landini MP. Human cytomegalovirus glycoprotein N (gN) genotypes in AIDS patients. *AIDS* 2003; 17:761-763