



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Pathogenesis of congenital cytomegalovirus infection : finding prognostic markers and correlates of protection**

Rovito, R.

### **Citation**

Rovito, R. (2018, October 16). *Pathogenesis of congenital cytomegalovirus infection : finding prognostic markers and correlates of protection*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/66319>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/66319>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/66319> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Rovito, R.

**Title:** esis of congenital cytomegalovirus infection : finding prognostic markers and correlates of protection

**Issue Date:** 2018-10-16

## ITALIAN SUMMARY

L'infezione da Citomegalovirus (CMV) e' un'infezione diffusa in tutto il mondo che, in una notevole proporzione di individui, rimane inosservata. Tuttavia, il virus puo' causare gravi manifestazioni quando, durante la gravidanza, infetta il feto passando attraverso la placenta. L'infezione congenita da CMV (cCMV) puo' indurre una varieta' di manifestazioni cliniche alla nascita (sintomi alla nascita), e di danni permanenti a lungo termine (LTI). Tali segni clinici possono anche variare in gravita', per esempio in neonati sintomatici alla nascita possono variare da enzimi epatici elevati a microcefalia (testa piu' piccola del normale). Le disabilita' permanenti a lungo termine (che vanno da danni neurologici a danni visivi) possono essere progressivi o manifestarsi tardi nell'infanzia, come per esempio la perdita dell'udito a esordio ritardato, ed in questo contesto una diagnosi retrospettiva potrebbe essere difficile. In particolare, del totale di neonati infetti alla nascita, il 13% e' sintomatico alla nascita, e meta' di loro sviluppa LTI. Tuttavia, il 13% dei neonati asintomatici alla nascita sviluppera' gli stessi LTI; e dal momento che questo gruppo e' molto piu' grande del gruppo di neonati sintomatici alla nascita, la maggior parte dei casi clinici di LTI deriva dal gruppo degli asintomatici. Ed e' proprio in quest'ultimo gruppo che la cCMV viene facilmente inosservata perche' non si vede nulla alla nascita. Riassumendo, non tutti i feti infetti avranno sintomi alla nascita o svilupperanno disabilita' a lungo termine. In questo momento, non c'e' nessun marcatore prognostico disponibile che possa predire quale neonato sviluppera' LTI, e quando o quale tipo di disabilita' avra'. La cCMV puo' avvenire in qualsiasi momento durante la gravidanza, e di solito quando avviene durante le fasi iniziali della gravidanza puo' causare dei danni piu' severi perche' il feto si sta ancora sviluppando. La cCMV puo' avvenire quando le madri si infettano per la prima volta durante la gravidanza (che erano sieronegative) oppure che erano gia' infette con CMV (sieropositive). Nell'ultimo caso, data la pre-esistente immunita' al CMV, la velocita' di trasmissione verticale (cioe' la trasmissione del CMV dalla madre al feto) e' di solito piu' bassa che in donne incinte sieronegative, ma non e' chiaro se tale immunita' protegga anche da diversi problemi clinici severi. Queste due variabili, il trimestre di infezione materna e la pre-esistente immunita', complicano gli studi sulla patogenesi di cCMV nella popolazione generale.

Lo scopo di questa tesi era di acquisire nuove conoscenze sulla patogenesi di cCMV, di identificare marker prognostici per l'esito clinico a breve e lungo termine, e correlati di protezione per lo sviluppo del vaccino. A tal proposito, e' stata usata una coorte retrospettiva su scala nazionale di bambini congenitamente infetti e di controlli (cioe' bambini non infetti). Tutti questi bambini sono nati nei Paesi Bassi nel 2008, e per diagnosticare cCMV sono stati utilizzati campioni di sangue essiccato (DBS). I DBS sono stati ottenuti da sangue intero dal tallone dei neonati entro una settimana dalla nascita. Questi campioni sono di solito usati di routine per lo screening delle malattie genetiche rare per le quali sono disponibili interventi clinici salva vita. Il DNA e' stato estratto da questi campioni, e la presenza del DNA virale e' stata utilizzata per diagnosticare cCMV. Inoltre, mediante quantificazione del DNA virale e' stata determinata la carica virale (che da' un'indicazione della quantita' di virus presente nel corpo). Dei bambini di questa coorte, erano disponibili i dati clinici dalla nascita fino a 6 anni d'eta'. Inoltre, sono stati ottenuti ulteriori campioni, sia dalle madri che dai bambini, sottoforma di tamponi buccali. Il DNA e' stato estratto dai tamponi buccali per



eseguire diversi studi genetici. Al fine di raggiungere i nostri obiettivi, si sono studiati i seguenti biomarkers in relazione alla carica virale, ai sintomi alla nascita e allo sviluppo di LTI a 6 anni d'età:

- markers per cellule B e cellule T, sia  $\alpha\beta$  che  $\gamma\delta$ , nei DBS;
- i profili di espressione genica con particolare attenzione ai pathways del sistema immunitario e infiammatorio;
- dati sugli aminoacidi essenziali, ormoni, carnitine ed enzimi su DBS;
- tipizzazione HLA (antigene leucocitario umano) sui tamponi buccali sia delle madri che dei bambini con cCMV.

Nei seguenti paragrafi sono presentati i principali risultati di tutti i capitoli. Prima di tutto, sono presentati i sopracitati biomarkers in relazione all'infezione cCMV e alla carica virale. Poi, tali biomarkers sono stati presentati in relazione ai sintomi alla nascita ed allo sviluppo di LTI.

### Infezione congenita da CMV

Al fine di studiare l'effetto di cCMV sui diversi markers, abbiamo comparato i biomarkers dai DBS o dai tamponi buccali in bambini con cCMV a quelli senza cCMV (il nostro gruppo di controllo). Nella nostra coorte, cCMV e' risultato in una riduzione della produzione delle cellule T  $\alpha\beta$  nel timo, in un aumentato numero delle cellule T  $\gamma\delta$ , e in un'aumentata produzione delle cellule B (**Capitolo 2**). Inoltre, cCMV ha provocato l'esaurimento delle cellule T (cioe' uno stato generale di disfunzione cellulare solitamente indotto dalle infezioni croniche e dall'esposizione ad alte cariche virali) (**Capitolo 4**). Di questi markers, solo la produzione delle cellule T  $\alpha\beta$  non era associata alla carica virale. Nel **Capitolo 4**, il profilo di espressione genica su DBS ha mostrato che l'espressione genica relativa alla risposta immunitaria innata e all'attivazione delle cellule NK era piu' elevata nei bambini con una carica virale elevata. Il sistema immunitario innato, le cellule NK e le cellule T  $\gamma\delta$  potrebbero svolgere un ruolo nel controllare CMV nel feto, dove le risposte CMV-specifiche si stanno ancora sviluppando. Inoltre, lo specifico HLA di classe II HLA-DRB1\*04 (cioe' una molecola che presenta componenti virali alle cellule immunitarie) e' risultata correlata ad un miglior controllo virale nei bambini (**Capitolo 6**). Tale effetto positivo sul controllo virale potrebbe dipendere dal fatto che le molecole HLA di classe II supportano entrambe le braccia della risposta immunitaria, citotossica e anticorpale. Inoltre, cCMV non ha influenzato il metabolismo neonatale su DBS, ma un ridotto livello di aminoacidi essenziali (componenti delle proteine) e' stato trovato nel sottogruppo di bambini infetti nati prematuri (cioe' prima delle 37 settimane di gestazione) comparata al sottogruppo di bambini senza cCMV nati prematuri (**Capitolo 3**). Sebbene cCMV non abbia influenzato il metabolismo neonatale, una carica virale elevata ha indotto un aumento di C16 (**Capitolo 3**). C16 e' un acido grasso e precursore di acidi grassi a catena piu' lunga, per il quale la struttura esterna virale e' arricchita. Pertanto, l'aumento di C16 nel gruppo con carica virale elevata potrebbe semplicemente riflettere l'aumentato onere virale a livello cellulare.

## Sintomi alla nascita

I diversi markers sono stati studiati anche in relazione alla presenza di sintomi alla nascita, comparandoli tra il gruppo di bambini infetti con sintomi alla nascita e bambini infetti privi di sintomi. Gli unici markers associati a sintomi alla nascita sono stati trovati studiando le molecole HLA di entrambe madri e bambini, con la loro specifica combinazione. Nel **Capitolo 5** e **Capitolo 6** abbiamo valutato il ruolo delle molecole HLA di Classe I e Classe II, così come dei recettori delle cellule NK materne, in relazione all'esito clinico. E' emerso che madri con lo specifico genotipo HLA-G delezione/delezione, o madri omozigoti per HLA-C1, così come coppie madre-figlio con discordanze per le molecole HLA-E ed HLA-C, fossero associate con sintomi alla nascita (**Capitolo 5**). Le madri con un genotipo HLA-G delezione/delezione probabilmente hanno livelli più elevati della proteina HLA-G che ha proprietà immunosoppressive. L'immunosoppressione potrebbe indurre un ridotto controllo virale sull'infezione durante la gravidanza, e potrebbe indurre un aumentato carico virale a livello della placenta. Una discordanza HLA si ha quando la madre non ha la stessa informazione genetica del feto, perché alcune delle informazioni genetiche derivano dal padre e potrebbero essere diverse da quella della madre. Nel **Capitolo 5**, abbiamo dimostrato che in caso di discordanza HLA-E e HLA-C le chance di un bambino con sintomi alla nascita erano più alte. Una discordanza di HLA, come HLA-E e HLA-C che sono molecole espresse dalla placenta, potrebbe indurre la formazione di cellule T materne capaci di attaccare i tessuti fetali. Normalmente, tale processo è soppresso, ma in caso di infezione della placenta da CMV, tale equilibrio potrebbe essere alterato ed indurre reazioni delle cellule T contro la placenta ed il feto. Inoltre, la concordanza HLA è necessaria per un'adeguata risposta immunitaria contro le cellule infette. Pertanto, una discordanza HLA potrebbe indurre una peggior reazione immunitaria e un minor controllo dell'infezione, con una conseguente carica virale placentare e fetale più elevata. Infine, una delle popolazioni cellulari più abbondanti a livello placentare è rappresentata dalle cellule NK, che appartengono all'immunità innata, e pertanto possono reagire rapidamente dopo attivazione. Queste cellule hanno la peculiare caratteristica di avere diversi recettori attivatori e inibitori la cui combinazione definisce il grado di attivazione delle cellule NK. Le molecole HLA-C possono legare tali recettori con diversi gradi di forza. Nella nostra coorte, le madri con neonati sintomatici alla nascita più frequentemente non avevano il tipo inibitorio di HLA-C, e pertanto i segnali attivatori sulle cellule NK potrebbero prevalere contribuendo all'infiammazione placentare già elevata (**Capitolo 5**). Nel **Capitolo 6** sono state studiate le molecole HLA non espresse dalla placenta. Per queste molecole non sono state trovate associazioni con sintomi alla nascita. Riassumendo, i sintomi alla nascita sembrerebbero essere collegati a fattori genetici che contribuirebbero ad aumentare la carica virale materna e placentare, dovuti ad un ridotto controllo dell'infezione, e ad un'aumentata infiammazione della placenta.

## Disabilità a lungo termine

In tre capitoli sono stati descritti biomarkers che sembrerebbero essere associati con LTI a 6 anni d'età. Nel **Capitolo 2**, i bambini infetti che hanno sviluppato LTI hanno mostrato un numero ridotto di cellule B. Inoltre, abbiamo trovato un'aumentata percentuale di antigeni HLA-C materni non ereditati

(NIMA) in quei bambini infetti che hanno sviluppato LTI (**Capitolo 5**). Il feto e' esposto ad antigeni che lui/lei non ha ereditato, il cosiddetto NIMA, perche' durante la gravidanza e l'allattamento c'e' uno scambio mutuale di cellule tra la madre ed il bambino. Diverse cellule materne si collocano in diversi organi fetali e persistono almeno almeno fino all'eta' adulta. Tuttavia, invece che sviluppare una risposta immunitaria fetale contro questi antigeni materni "estranei", il feto sviluppa una tolleranza di lunga durata (effetto NIMA). L'effetto NIMA e' vantaggioso nel contesto del trapianto perche' puo' migliorare la sopravvivenza dell'organo. Tuttavia, durante le infezioni l'effetto NIMA potrebbe indurre una tolleranza indiretta anche all'infezione. Di conseguenza, durante tutta l'infanzia, una tolleranza indiretta all'infezione potrebbe indurre un'incontrollata replicazione virale. Inoltre, nel **Capitolo 4**, nei bambini che non sviluppano LTI c'era una piu' elevata espressione di markers anti infiammatori. Questo suggerisce ulteriormente che parte della patogenesi dello sviluppo di LTI puo' essere attribuibile ad un'incontrollata infezione ed infiammazione.

Lo scopo di questa tesi era di identificare marker prognostici per l'esito clinico a breve e lungo termine, e correlati di protezione per lo sviluppo del vaccino. Abbiamo trovato alcuni biomarkers interessanti che, se confermati in altre coorti, potrebbero essere potenziali candidati per tale scopo. Tuttavia, talvolta le differenze erano troppo piccole che non e' stato trovato un marker determinante. D'altro canto, abbiamo trovato alcuni indizi per una migliore comprensione della patogenesi di cCMV (cioe' i meccanismi biologici che conducono alla malattia). Comprendere la patogenesi di cCMV e' fondamentale per diverse ragioni, prima di tutto aiuterebbe la futura ricerca di marker prognostici, in secondo luogo supporterebbe l'introduzione di strategie cliniche innovative per prevenire, o perlomeno, influenzare positivamente l'esito clinico a breve e a lungo termine, questo perche' capiremmo i meccanismi del danno progressivo e permanente. Infatti, la strada verso un vaccino autorizzato e' troppo lunga per aspettare pazientemente. Tuttavia, alla fine, la vaccinazione dovrebbe essere lo scopo ultimo della ricerca su cCMV perche' eviterebbe la trasmissione verticale durante la gravidanza oppure eviterebbe lo sviluppo della malattia nel bambino. Infine, l'identificazione dei biomarker sopracitati potrebbe supportare la futura ricerca sullo sviluppo del vaccino.

Per concludere, dalla ricerca presentata in questa tesi, sono emerse diverse questioni che dovrebbero essere tenute in considerazione nella futura ricerca. La maggior parte dei bambini infetti con cCMV sono asintomatici alla nascita ed hanno una buona prognosi per uno sviluppo normale, pertanto e' essenziale la comparazione del loro stato immunologico con quella dei bambini sintomatici alla nascita che hanno un esito peggiore a lungo termine, cosi' come con quelli asintomatici che sviluppano gli stessi LTI, per poter determinare cosa stia succedendo nei bambini con cCMV. Contemporaneamente dovremmo anche definire nuove strategie cliniche e studiare se le attuali strategie cliniche siano vantaggiose per quei neonati asintomatici che sviluppano gli stessi LTI, e se per questo gruppo i benefici, per esempio della terapia antivirale, non superino gli effetti collaterali. Tuttavia, un traguardo ancora piu' urgente dovrebbe essere la standardizzazione delle definizioni di malattia sintomatica e sviluppo di LTI senza la quale non si possono trarre conclusioni affidabili circa la patogenesi di cCMV.