

## REVIEW

## Characterization and monitoring of host immune responses to infectious agents: what a future for microbiological diagnostics?

**Riccardo Dolcetti, Patrizia Comoli, Mario Luppi, Paola Martelli, Furio Parri, Antonio Rosato**

*Comitato di Studio per l'Immunologia (CoSIIm) dell'AMCLI*

**Key Words:** Cytokines, ELISPOT, Immunogenetics, Regulatory T cells, Tetramers, Toll-like receptors

**Caratterizzazione e monitoraggio della risposta immune ad agenti infettivi: quale futuro per la diagnostica microbiologica?**

### SUMMARY

Our knowledge on the mechanisms underlying microbial pathogenesis and host-microbe interactions has greatly improved over the last decade. In particular, the development of new and specific analytical methods has allowed the detailed characterization of innate and adaptive immune responses against clinically relevant microbial infections. Immunogenetic studies are continuously providing new insights on the genetic bases of individual differences in susceptibility to specific pathogens and most of the genetic markers identified so far include polymorphisms in genes controlling both innate and adaptive immune responses. Moreover, new standardized T cell assays allow reliable and reproducible evaluations of T cell phenotype and functions (i.e.: ELISPOT), including the identification of distinct functional signatures that are associated with the control of the infection. Although the number of these assays currently used in clinical practice is limited, a considerable increase is foreseen for the near future. This perspective constitutes an unprecedented opportunity for Clinical Microbiologists, who may now develop and apply integrated microbiologic/immunologic assays that may be useful for a more precise diagnostic definition and a more accurate clinical monitoring of the disease.

**Received December 16, 2008**

**Accepted February 18, 2009**

### INTRODUZIONE

Le conoscenze inerenti la risposta immune dell'ospite nei confronti di agenti infettivi patogeni di varia natura, sono notevolmente aumentate negli ultimi anni. Grazie allo sviluppo di metodologie d'indagine sempre più sofisticate e sensibili, è oggi possibile caratterizzare accuratamente le modalità e i meccanismi attraverso i quali si realizzano le risposte immuni rivolte contro agenti infettivi, consentendo spesso di mettere in evidenza alterazioni di tali risposte nel corso della malattia o le strategie di immunoevasione attuate dai patogeni. Alcune determinazioni immunologiche sono già entrate nella pratica clinica ed è prevedibile che le possibilità di una loro applicazione clinica aumentino notevolmente nel prossimo futuro. Tale prospettiva costituisce un'importante opportunità per il Microbiologo Clinico in quanto potrà consentirgli di realizzare e applicare pac-

chetti diagnostici integrati microbiologico-immunologici in grado di fornire al Clinico terapeuta informazioni utili per un più preciso inquadramento diagnostico e per effettuare un monitoraggio accurato e personalizzato della malattia.

Il presente articolo non ha la pretesa di costituire una revisione esaustiva dell'argomento, ma intende fornire una prospettiva delle possibili applicazioni in campo microbiologico ed infettivologico dei saggi in grado di caratterizzare vari aspetti della risposta immune dell'ospite nei confronti di agenti patogeni.

Negli ultimi anni si sono accumulate numerose evidenze che indicano in modo convincente come fattori genetici dell'ospite siano in grado di condizionare la suscettibilità individuale a contrarre infezioni clinicamente rilevanti. Ciò è stato ampiamente favorito dagli studi di genomica che hanno consentito l'identificazione di numerose

**Corresponding author: Riccardo Dolcetti**

U.O. Bioluminoterapia dei Tumori Umani, Centro di Riferimento Oncologico - IRCCS  
Via Franco Gallini 2, 33081 Aviano (PN); Italy - Tel: 0434 659660 - Fax: 0434 659659;  
E-mail: [rdolcetti@cro.it](mailto:rdolcetti@cro.it)

varianti genetiche, usualmente polimorfismi genici, che sono state successivamente associate dal punto di vista funzionale a variazioni nella modalità o nell'efficienza della risposta immune ad agenti patogeni. Una particolare rilevanza sembrano rivestire i polimorfismi a carico di geni coinvolti nell'immunità innata, la prima barriera di difesa immunologica nei confronti degli agenti infettivi (4). Oggi sappiamo che i patogeni sono riconosciuti dai macrofagi, cellule natural killer (NK), cellule dendritiche e granulociti grazie all'interazione coordinata di alcune famiglie di recettori proteici che comprendono tra l'altro i recettori Toll-like (TLR) e i recettori nucleotide-binding oligomerization domain-like (NLR) (34, 35). Poiché le cellule coinvolte nell'immunità innata riconoscono soltanto un numero limitato di determinanti microbici altamente conservati, i cosiddetti "microbial-associated molecular patterns" (PAMPs) (34, 35), attraverso un altrettanto limitato numero di recettori, polimorfismi funzionalmente rilevanti nei geni codificanti per tali molecole recettoriali possono avere ricadute importanti per quanto concerne la predisposizione individuale a contrarre determinate infezioni. Di fatto, a tutt'oggi sono stati identificati circa una ventina di diversi polimorfismi a carico di geni i cui prodotti sono coinvolti nell'immunità innata e che sono stati associati ad una maggiore o minore suscettibilità a contrarre infezioni da patogeni prevalentemente batterici, fungini, o parassitari (per approfondimenti vedi Ref. 4-7). Ad esempio, è stato recentemente riportato come alcuni polimorfismi del gene codificante per il TLR-4 siano significativamente associati ad un maggior rischio di sviluppare aspergillosi invasiva in pazienti che hanno ricevuto un trapianto di cellule staminali emopoietiche (5). Inoltre, polimorfismi del TLR-9 sono stati associati ad una rapida progressione della malattia da HIV (7). Anche polimorfismi in geni coinvolti nell'immunità acquisita influenzano la suscettibilità ad infezioni. Ciò è di particolare rilievo per i geni HLA di classe I e II che sono responsabili della presentazione di peptidi antigenici rispettivamente ai linfociti T CD8+ e CD4+. La condizione di eterozigosi per alleli HLA correla generalmente con la resistenza alle infezioni, probabilmente in quanto consente di disporre di un maggior spettro di varianti alleliche in grado di presentare antigeni microbici al sistema immune. Sono state dimostrate associazioni significative tra particolari combinazioni di alleli HLA (alotipi) e resistenza a vari agenti patogeni, tra cui *Mycobacterium tuberculosis*, HIV, *Mycobacterium leprae*, *Entamoeba histolytica* (14). Altre forme di resistenza ad infezioni su base genetica comprendono l'anemia falciforme e l'in-

fezione da *Plasmodium falciparum*, la negatività per il gruppo sanguigno Duffy e la malaria da *Plasmodium vivax*, e la delezione di 32-bp nel recettore chemochinico CCR5 che rende gli individui omozigoti resistenti all'infezione da HIV CCR5-tropici (14). Oggi disponiamo quindi di una lista relativamente ampia di marcatori genetici di predisposizione ad infezioni che nel medio periodo potrà consentire l'identificazione di individui a rischio che potrebbero beneficiare di misure di profilassi individualizzate.

I contesti clinici in cui le determinazioni di immunogenetica potranno essere utili per predire il rischio di gravi complicanze infettive sono certamente rappresentati dall'immunodepressione conseguente a chemioterapia mieloablativa, trapianto d'organo o di cellule staminali emopoietiche o terapia con corticosteroidi per malattie autoimmuni. Oltre a migliorare l'efficacia dei vaccini attualmente in via di sviluppo, le analisi immunogenetiche potranno anche consentire l'identificazione di soggetti geneticamente predisposti a rispondere in modo subottimale alla vaccinazione. Per comprendere le possibili ricadute applicative di tali analisi basti pensare alla rilevanza clinica che i vaccini avranno nel prossimo futuro nella prevenzione di gravi malattie infettive quali la tubercolosi, la malaria, l'infezione da HIV/AIDS e l'influenza aviaria. Occorre comunque ricordare che alcuni marcatori immunogenetici, quali alcuni alotipi HLA, polimorfismi dei geni codificanti per recettori inibenti le cellule NK (i cosiddetti KIR) o per citochine sono stati associati anche a una diversa storia naturale e ad un diverso andamento clinico dell'infezione da HCV, HIV, virus respiratorio sinciziale, virus Dengue e plasmodio malarico (9, 13, 15, 17, 21).

A differenza delle indagini sierologiche che costituiscono una ben consolidata tipologia di analisi per valutare la risposta umorale ad agenti infettivi, le metodiche in grado di caratterizzare le risposte T cellulari non hanno finora avuto una significativa applicazione in campo clinico. Ciò è da imputarsi a motivazioni di tipo tecnico, quali la complessità di isolamento e manipolazione dei linfociti T e la mancanza di saggi standardizzati, eseguibili facilmente e in tempi contenuti in grado di quantificare le diverse funzioni di tali effettori immuni. Inoltre, le scarse evidenze di correlazioni tra parametri clinici e marcatori quantitativi e qualitativi della risposta T cellulare hanno rappresentato limiti concettuali che non hanno certamente favorito lo sviluppo e l'applicazione di test per la funzione T cellulare. Tuttavia, il recente sviluppo di saggi standardizzati per analizzare le risposte T cellulari può oggi consentire valutazioni attendibili e riproducibili di diverse proprietà

funzionali dei linfociti T e ha permesso l'identificazione di "impronte" funzionali associate ad un efficace controllo di vari tipi di infezioni, particolarmente quelle sostenute da virus.

Ciò è stato reso possibile anche grazie ad importanti acquisizioni concettuali concernenti le cellule T memoria, l'eterogeneità funzionale dei linfociti T e le correlazioni tra immunofenotipo e funzione. È stato dimostrato, infatti, che in seguito all'incontro con virus, i linfociti specifici per antigeni virali seguono un percorso differenziativo che può essere monitorato dall'analisi dell'espressione di specifici determinanti di membrana: le cellule naïve CD3+CD8+CCR7+CD45RA+ danno origine a distinte popolazioni di cellule della memoria centrale (CCR7+CD45RO+), effettori memoria (CCR7-CD45RO+) ed effettori memoria terminalmente differenziati (CCR7-CD45RA+), ciascuna contraddistinta da specifiche proprietà funzionali (32).

In particolare, gli effettori memoria sono contraddistinti dalla rapida attivazione di funzioni effettrici quali la secrezione di interferone- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e interleuchina-2 (IL-2). Al contrario, le cellule T della memoria centrale sono incapaci di espletare tali funzioni in tempi rapidi e secernono prevalentemente IL-2, pur essendo in grado di differenziare efficientemente ad effettori memoria in seguito a stimolazioni secondarie. Studi recenti hanno dimostrato che l'espansione di sottopopolazioni di linfociti T identificate immunofenotipicamente (es.: CD8+CD54RA+CCR7-CD27-) correla con un efficace controllo della replicazione virale nel contesto dell'infezione da CMV e in soggetti con malattia da HIV-1 non progressiva (28). Analisi immunofenotipiche possono inoltre consentire la valutazione di linfociti T ad azione immunosoppressiva, le cosiddette cellule T regolatorie (Treg), che si espandono *in vivo* in seguito all'infezione da parte di agenti patogeni (3). Le cellule Treg possono essere grossolanamente distinte in naturali e inducibili e sono caratterizzate dall'espressione di CD4, CD25 e del fattore trascrizionale FOXP3. Nonostante l'attuale comprensione del loro ruolo nel controllo di varie infezioni sia ancora limitata, disponiamo di alcune evidenze che suggeriscono la possibile rilevanza clinica di una loro caratterizzazione. In generale, un incremento del numero di cellule Treg circolanti si associa ad una depressione delle risposte immuni mediate dai linfociti T virus-specifici (3). Nel contesto dell'infezione da HCV, in particolare, è stato dimostrato che la persistenza virale è associata all'aumento del numero di cellule Treg funzionalmente attive (Ebinuma, 2008). D'altra parte, tuttavia, vi sono situazioni in cui il controllo immunologico esercitato dalle cellule Treg non è sufficiente a

prevenire patologie immuno-mediate, quale ad esempio il danno epatocellulare in corso di infezione da HBV o HCV. In ogni caso, trattamenti in grado di intervenire sul numero o sulla funzione di cellule Treg si sono rivelati di potenziale rilevanza terapeutica. Su queste basi è pertanto ipotizzabile che, in prospettiva futura, la determinazione del numero di cellule Treg circolanti possa rivestire una valenza diagnostica in campo microbiologico.

Oggi è anche possibile eseguire caratterizzazioni immunofenotipiche di rilevanza funzionale selezionando i linfociti T specifici per determinati peptidi antigenici di derivazione batterica o virale, consentendo in tal modo di monitorare selettivamente gli effettori direttamente coinvolti nel controllo dell'infezione. Ciò è stato reso possibile dall'applicazione in citofluorimetria dei complessi tetrameric MHC-peptide o "tetrameri". Tali reagenti sono costituiti da un complesso formato da 4 molecole HLA ricombinanti ciascuna caricata con un peptide immunogenico (epitopo) e pertanto in grado di interagire funzionalmente con il recettore per l'antigene (T cell receptor, TCR) di linfociti T antigene-specifici. La molecola tetrameric può essere coniugata covalentemente con vari fluorocromi consentendo pertanto lo studio multiparametrico dell'assetto fenotipico e differenziativo dei linfociti T antigene-specifici, nonché la loro precisa quantificazione. L'uso della tecnologia dei tetrameri si è rivelato molto utile in diversi ambiti clinici in quanto esiste una stretta correlazione tra la presenza di cellule CD8+ e CD4+ specifiche per un virus ed una difesa efficace contro il virus stesso. In particolare, l'identificazione degli epitopi immunogenici delle 2 maggiori proteine antigeniche di CMV (pp65 e p72) in combinazione con l'uso di tetrameri in citofluorimetria ha consentito di definire l'entità e la cinetica della risposta dei linfociti T CD8+ CMV-specifici durante l'immunoricostituzione in pazienti che hanno ricevuto un trapianto di cellule staminali emopoietiche (12). Le evidenze finora disponibili indicano come un numero ridotto di linfociti T CD8+ CMV-specifici sia associato ad un elevato rischio di sviluppare la malattia da CMV (12,19,25). L'esperienza clinica indica, tuttavia, come l'infezione da CMV si possa riattivare in anche un alcuni pazienti trapiantati che presentano normali valori di linfociti T CMV-specifici quantificati con la tecnologia dei tetrameri (18). Inoltre è stato dimostrato che la presenza di risposte dirette soltanto contro alcuni specifici antigeni di CMV possa essere protettiva nei confronti di una possibile malattia da CMV, in pazienti sottoposti a trapianto di rene (8). Dato che tale riattivazione può essere imputata a difetti funzionali dei

T linfociti e non solo ad una loro riduzione numerica (26), sono stati sviluppati saggi funzionali che consentono un'analisi qualitativa di tali effettori immuni. A tale scopo è stata perfezionata la tecnica dei tetrameri implementandola con la possibilità di valutare sui T linfociti antigene-specifici l'espressione di citochine mediante colorazione intracellulare in citofluorimetria. Ciò ha consentito, ad esempio, di dimostrare che integrando la quantificazione numerica dei linfociti T CMV-specifici con una concomitante analisi funzionale (produzione di IFN- $\gamma$ ) è possibile effettuare un più accurato monitoraggio dei pazienti trapiantati per ciò che concerne la possibile riattivazione di CMV, particolarmente nei casi trattati con terapia corticosteroidica (19, 23). Un altro saggio di rilevanza funzionale è l'ELISPOT, acronimo di Enzyme-linked ImmunoSPOT, attribuito ad una metodica immunologica inizialmente applicata per contare il numero di linfociti B secernenti anticorpi. Nella sua versione più attuale è utilizzato per enumerare i linfociti T in grado di essere attivati specificamente da un dato antigene sulla base della rilevazione di citochine prodotte in seguito alla stimolazione antigenica. Pertanto l'ELISPOT è stato recentemente indicato, tra le metodiche *ex-vivo*, come quella capace di quantificare e valutare con notevole sensibilità la risposta immune, per esempio ai vaccini antivirali ed antitumorali.

L'applicazione di ELISPOT certamente più conosciuta è nell'ambito della diagnostica dell'infezione tubercolare dove si è rivelata in grado di discriminare direttamente le cellule T che rispondono esclusivamente a proteine espresse dal *Mycobacterium tuberculosis* (ESAT6 e CFP10). Il test si basa sul rilascio di IFN- $\gamma$  da parte dei linfociti T e sembra essere privo di alcuni limiti dell'intradermoreazione alla tubercolina. Si tratta infatti di un test *in vitro* di pratica esecuzione, privo di effetti di richiamo e/o potenziamento di ipersensibilità preesistenti, che non risente di una pregressa vaccinazione con il bacillo di Calmette-Guérin (BCG) e non è influenzabile da interpretazioni soggettive. Accanto all'ELISPOT-IFN- $\gamma$  è anche disponibile commercialmente un classico test ELISA sostanzialmente equivalente in termini di affidabilità e risultati. Le evidenze ottenute finora confermano una maggiore specificità di tali saggi ematici rispetto al test cutaneo, rendendoli pertanto preferibili in tutte le popolazioni caratterizzate da significativa prevalenza di vaccinazione con BCG o di infezione da micobatteri non tubercolari residenti (come gli operatori sanitari) o immigrate da altri paesi. I test basati sul rilascio di IFN- $\gamma$  hanno inoltre dimostrato una maggiore sensibilità nella diagnosi di infezione tubercolare

latente in pazienti immunocompromessi, suggerendo quindi una loro applicazione nello screening dei pazienti con immunodeficienza primaria o acquisita. Sulla base di questi risultati, importanti società scientifiche hanno recentemente proposto linee guida che raccomandano l'uso di questi test per la diagnosi di tubercolosi latente, mentre la loro utilità clinica nella valutazione di pazienti con sospetta TBC attiva resta da ancora definire (22, 24, 27).

Un'altra importante applicazione dell'ELISPOT in campo microbiologico concerne il suo utilizzo per l'identificazione dei pazienti trapiantati ad elevato rischio di sviluppare linfoproliferazioni EBV-correlate (PTLD). In tale ambito, il saggio ELISPOT sembra di particolare utilità nel complementare il monitoraggio del carico del DNA di EBV, metodica che si è rivelata peraltro molto utile per valutare la risposta alla terapia, consentendone un'opportuna modulazione a livello del singolo paziente (20). Tuttavia, elevati carichi di EBV non sempre sono indicativi dello sviluppo di PTLT, in quanto tali linfoproliferazioni possono insorgere anche in assenza di un concomitante incremento della quantità del DNA di EBV circolante (20, 33, 36). Ciò indica che la sola determinazione del carico di EBV non è sufficiente a predire il rischio di PTLT. Dati recenti suggeriscono come la determinazione del numero dei linfociti T EBV-specifici circolanti, effettuata mediante le tecniche dell'ELISPOT o dei tetrameri, possa incrementare significativamente il potere predittivo del solo carico di EBV (33). In particolare, è stato dimostrato che nell'ambito di pazienti trapiantati di fegato che sono andati incontro ad infezione primaria da EBV, il PTLT è insorto soltanto in quelli che mostravano sia carichi elevati di EBV che un basso numero di linfociti T EBV-specifici circolanti ( $< 2/\text{mm}^3$ ) (33).

Più recentemente, il conteggio delle cellule T specifiche per polyomavirus BK (BKV) mediante metodica ELISPOT si è dimostrato un utile complemento al dosaggio del DNA plasmatico nell'identificare riceventi di trapianto renale con nefropatia BKV-associata in fase preclinica (11). In particolare, la valutazione dell'immunità cellulare specifica consente di ottimizzare il trattamento *pre-emptive* della nefropatia, modulando l'entità e la durata dell'intervento terapeutico sulla base della capacità del singolo paziente di sviluppare una protezione immuno-mediata al virus (10). Inoltre, l'applicazione di ELISPOT è stata descritta nell'ambito di pazienti trapiantati di organo solido ed affetti da patologie autoimmuni, in trattamento prolungato con corticosteroidi, che hanno sviluppato un sarcoma di Kaposi (SK), associato ad infezione primaria e/o riattivazione da human

herpesvirus-8 (HHV-8). Questo test ha dimostrato come esista una stretta correlazione tra la presenza di risposte linfocitarie CD4 e CD8 dirette contro antigeni latenti e litici di HHV-8 e lo stato di remissione di malattia, e viceversa come la progressiva riduzione e scomparsa di tale riposte virus-specifiche, si associ alla recidiva di malattia (1,2). Tali risultati sono di particolare rilievo, laddove si consideri che in un numero significativo di pazienti con SK post-trapianto a localizzazione cutanea, non è possibile identificare una correlazione tra il carico virale di HHV-8 e l'evoluzione clinica delle lesioni tumorali.

Studi recenti, dapprima in ambito murino, poi anche nell'uomo, hanno dimostrato che l'immunità adattiva svolge un ruolo preponderante nelle difese dell'ospite contro infezioni fungine. In particolare, un'immunità cellula-mediata polarizzata a cellule T helper di tipo 1 (T<sub>H</sub>1), produttrice di IFN- $\gamma$ , risulta protettiva nei confronti di infezioni fungine, specialmente l'aspergillosi invasiva; mentre un'immunità cellula-mediata polarizzata a cellule T helper di tipo 2 (T<sub>H</sub>2), produttrice di interleuchina 10 (IL-10), risulta permissiva nei confronti dell'aspergillosi invasiva (31). L'utilità di ELISPOT nella diagnosi di aspergillosi invasiva è stata dimostrata in una piccola serie di pazienti neutropenici con leucemia mieloide acuta, nella maggior parte dei quali gli esami di routine, compreso il test per il galattomannano, sono viceversa risultati negativi (29, 30). In questi studi, con l'ausilio dell'ELISPOT, è stata descritta, per la prima volta nell'uomo, la cinetica della risposta immune in corso di aspergillosi invasiva mostrando:

- 1) elevati livelli di IL-10-T<sub>H</sub>2 alla diagnosi e durante la progressione di malattia;
- 2) l'incremento dei livelli di IFN $\gamma$ -T<sub>H</sub>1, necessario per raggiungere la remissione in tutti i pazienti;
- 3) persistenti livelli di IL-10-T<sub>H</sub>2 che possono controbilanciare l'aumento dei livelli di IFN $\gamma$  per evitare una eccessiva reazione infiammatoria, analogamente a quanto osservato nei modelli murini;
- 4) la persistenza di una risposta IFN $\gamma$ -T<sub>H</sub>1 anche dopo la rimozione chirurgica della lesione polmonare, indicativa di una ripristinata immunità protettiva analogamente a quanto si osserva nei soggetti sani.

Occorre tuttavia considerare come si debbano risolvere ancora diverse problematiche prima di un più ampio utilizzo dei saggi immunologici nel campo della Microbiologia Clinica. In primo luogo i numerosi dati finora ottenuti necessitano di una validazione nei vari contesti clinici, in modo tale da definire nel modo più preciso possi-

bile i concreti campi di applicazione. Per quanto concerne le varianti di geni coinvolti nell'immunità innata o acquisita occorrerà avvalersi di saggi multiparametrici in grado di analizzare simultaneamente ed in modo automatizzato diversi polimorfismi genetici. L'orientamento attuale prevede lo sviluppo di test basati sui polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) in quanto hanno il vantaggio di poter essere valutati con analisi di tipo "high-throughput" e quantitativo. Al fine di ridurre i costi di tali indagini, è anche prevedibile l'allestimento di saggi "mirati" per diverse problematiche microbiologiche, in grado di analizzare soltanto i polimorfismi genici che hanno ricevuto un'adeguata validazione in quel particolare contesto clinico.

Più complessa è la situazione relativa ai saggi relativi alle risposte T cellulari. Occorre infatti considerare che tali test non consentono una valutazione completa dell'ampiezza della risposta immune dell'ospite nei confronti di un agente patogeno. È il caso ad esempio dei saggi basati sull'utilizzo di complessi tetrameric MHC-peptide che limitano l'indagine alle risposte immuni mediate soltanto da alcuni alleli HLA del paziente e rivolte soltanto verso alcuni determinanti antigenici del patogeno. Sebbene le combinazioni MHC-peptide finora studiate si siano dimostrate in grado di fornire informazioni clinicamente rilevanti, occorre sempre considerare che tali saggi non consentono di effettuare un monitoraggio "globale" delle risposte T cellulari specifiche per gli agenti patogeni. Sono allo studio soluzioni, quali l'utilizzo di proteine ricombinanti o di miscele di peptidi selezionati, che dovrebbero ovviare almeno in parte a tali limitazioni.

Un altro aspetto di cruciale importanza è la standardizzazione dei reagenti e dei saggi di immunologia cellulare, ambito che è stato esplorato soltanto da poco tempo. Occorre infatti considerare che i saggi di immunologia cellulare sono intrinsecamente più complessi, e pertanto tendenzialmente meno riproducibili, rispetto ai test immunologici tradizionali. Inoltre, saggi quali l'ELISPOT o i tetrameri sono frequentemente utilizzati per identificare e quantificare rare popolazioni di cellule T antigene-specifiche, con valori spesso molto vicini ai limiti inferiori di sensibilità della metodica. E' necessario pertanto dimostrare in modo inequivocabile che un saggio possiede una riproducibilità minima sufficiente a garantire dati attendibili e pertanto di valore clinico.

Probabilmente uno dei pochi test di immunologia cellulare standardizzato e attualmente applicato ad una malattia infettiva è costituito dai saggi basati sul rilascio di IFN- $\gamma$  per la diagnosi di tubercolosi latente. Tale applicazione è stata

anche oggetto di linee guida *ad hoc* redatte da importanti Agenzie internazionali (22, 24). Recentemente sono state presentate alla comunità scientifica internazionale alcune linee guida generali di armonizzazione dei test di immunologia cellulare realizzate da un ampio pannello di esperti internazionali (16). Tali linee guida forniscono utili riferimenti per una corretta applicazione dei saggi di immunologia cellulare sia in campo microbiologico-infettivologico che per quanto riguarda i tumori e l'autoimmunità e costituiscono un passo importante verso la standardizzazione. Infine, gli sviluppi recenti suggeriscono che un immunomonitoraggio adeguato debba prevedere l'uso combinato di diversi test in grado di fornire informazioni sulla frequenza e sulla funzione delle cellule T antigene-specifiche circolanti. Considerato l'impatto clinico esercitato da effettori dell'immunità naturale e dalle cellule T regolatorie, il monitoraggio dell'immunità ad agenti infettivi dovrebbe comprendere anche lo studio di tali popolazioni cellulari. Resta comunque ancora da definire quale sia il numero minimo di determinazioni immunologiche utili ai fini diagnostici e soprattutto come integrare tali saggi con le analisi microbiologiche tradizionali. In tale contesto il Microbiologo Clinico è chiamato fin d'ora a svolgere un ruolo importante per quanto concerne la definizione concreta e puntuale dei campi di applicazione diagnostica di nuovi saggi immunologici. Ciò potrà permettere al Microbiologo Clinico di valorizzare il proprio ruolo professionale contribuendo in modo determinante a migliorare il governo clinico.

## BIBLIOGRAFIA

- Barozzi P, Bovini C, Potenza L, et al. Changes in the immune responses against human herpesvirus-8 in the disease course of post-transplant Kaposi sarcoma. *Transplantation* 2008; 86: 738-44
- Barozzi P, Potenza L, Riva G, et al. Changes in T cell responses against Human Herpesvirus-8 correlate with the disease course of iatrogenic Kaposi's sarcoma in a patient with undifferentiated arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2008; July 16, Epub ahead of print
- Belkaid Y. Role of Foxp3-positive regulatory T cells during infection. *Eur J Immunol* 2008; 38: 918-921
- Bochud PY, Bochud M, Telenti A, et al. Innate immunogenetics: a tool for exploring new frontiers of host defence. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 531-542
- Bochud PY, Chien JW, Marr AK, et al. Toll-like Receptor 4 Polymorphisms and Aspergillosis in Stem-Cell Transplantation. *New Engl J Med* 2008; 359: 1766-1777
- Bochud PY, Hersberger M, Taffé P, et al; the Swiss HIV Cohort Study. Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection. *AIDS* 2007; 21: 441-446
- Bochud PY, Hawn TR, Siddiqui MR, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. *J Infect Dis* 2008; 197: 253-261
- Bunde T, Kirchner A, Hoffmeister B, et al. Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med* 2005; 201: 1031-1036
- Chaturvedi U, Nagar R, Shrivastava R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 47: 155-166
- Comoli P, Hirsch HH, Ginevri F. Cellular immune responses to BK virus. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13: 569-574
- Ginevri F, Azzi A, Hirsch HH, et al. Prospective monitoring of polyomavirus BK replication and impact of pre-emptive intervention in pediatric kidney recipients. *Am J Transplant* 2007; 7: 2727-2735
- Gratama JW, van Esser JW, Lamers CH, et al. Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection. *Blood* 2001; 98: 1358-1364
- Hansen DS, Evans KJ, D'Ombrain MC, et al. The natural killer complex regulates severe malarial pathogenesis and influences acquired immune responses to Plasmodium berghei ANKA. *Infect Immun* 2005; 73: 2288-2297
- Hill AV. Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. *Annu Rev Genet* 2006; 40: 469-486
- Hoebbe B, Rietveld E, Bont L, et al. Association of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis with interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha polymorphisms. *J Infect Dis* 2003; 187:2-11
- Janetzki S, Panageas KS, Ben-Porat L, et al. Elispot Proficiency Panel of the CVC Immune Assay Working Group. Results and harmonization guidelines from two large-scale international Elispot proficiency panels conducted by the Cancer Vaccine Consortium (CVC/SVI). *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57: 303-315
- Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004; 305: 872-874
- Lacey SF, Gallez-Hawkins G, Crooks M, et al. Characterization of cytotoxic function of CMV-pp65-specific CD8+ T-lymphocytes identified by HLA tetramers in recipients and donors of stem-cell transplants. *Transplantation* 2002; 74: 722-732
- Lilleri D, Gerna G, Fornara C, et al. Prospective simultaneous quantification of human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cell reconstitution in young recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Blood* 2006; 108: 1406-1412
- Loren AW, Porter DL, Stadtmauer EA, et al. Post-transplant lymphoproliferative disorder: a review. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 145-155
- Martin MP, Qi Y, Gao X, et al. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet* 2007; 39: 733-740
- Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, et al; Division of Tuberculosis Elimination, National Center for HIV, STD, and TB Prevention, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection, United States. *MMWR Recomm Rep* 2005; 54: 49-55
- Morita-Hoshi Y, Heike Y, Kawakami M, et al. Functional analysis of cytomegalovirus-specific T lymphocytes compared to tetramer assay in patients

- undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 515-521
24. NICE. Clinical guideline 33. Tuberculosis: clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control. London: National Institute for Health and Clinical Excellence, 2006. <http://nice.org.uk/page.asp?o=CG033>NICE guideline
  25. Ohnishi M, Sakurai T, Heike Y, et al. Evaluation of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution in patients after various allogeneic haematopoietic stem cell transplantation using interferon-gamma-enzyme-linked immunospot and human leucocyte antigen tetramer assays with an immunodominant T-cell epitope. *Br J Haematol* 2005; 131: 472-479
  26. Ozdemir E, St John LS, Gillespie G, et al. Cytomegalovirus reactivation following allogeneic stem cell transplantation is associated with the presence of dysfunctional antigen-specific CD8+ T cells. *Blood* 2002; 100: 3690-3697
  27. Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med* 2008; 149: 177-184
  28. Pantaleo G, Harari A. Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring virus-associated diseases. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 417-423
  29. Potenza L, Barozzi P, Rossi R, et al. Assessment of Aspergillus-Specific T Cells for Diagnosis of Invasive Aspergillosis in a Leukemic Child with Liver Lesions Mimicking Hepatosplenic Candidiasis. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 10: 1625-1628
  30. Potenza L, Barozzi P, Vallerini D, et al. Diagnosis of invasive aspergillosis by tracking Aspergillus-specific T cells in hematologic patients with pulmonary infiltrates. *Leukemia* 2007; 21: 578-581
  31. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nature Reviews Immunol* 2004; 4: 1-13
  32. Sallusto F, Lenig D, Förster R, et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401: 708-712
  33. Smets F, Latinne D, Bazin H, et al. Ratio between Epstein-Barr viral load and anti-Epstein-Barr virus specific T-cell response as a predictive marker of posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* 2002; 73: 1603-1610
  34. Strober W, Murray PJ, Kitani A, et al. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 9-20
  35. Takeuchi O, Akira S. Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol Rev* 2007; 220: 214-224
  36. Vajro P, Lucariello S, Migliaro F, et al. Predictive value of Epstein-Barr virus genome copy number and BZLF1 expression in blood lymphocytes of transplant recipients at risk for lymphoproliferative disease. *J Infect Dis* 2000; 181: 2050-2054