



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di *Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari*

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : Scienze Mediche, Cliniche e Sperimentali

INDIRIZZO: Metodologia Clinica, Scienze Endocrinologiche, Diabetologiche e

Nefrologiche

CICLO XXVIII

***Ricostituzione dell' immunità cellulare CMV-specifica
nel trapianto di organo solido***

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Roberto Vettor

Supervisore :Ch.mo Prof. Luciana Bonfante

Dottorando : Marianna Alessi

INDICE

RIASSUNTO.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUZIONE.....	5
1.1 Il trapianto di organo solido (SOT).....	5
1.2 Infezioni nel periodo post-trapianto.....	7
1.3 Il Citomegalovirus umano (CMV).....	11
1.4 La risposta immunitaria verso CMV.....	14
1.5 Fattori di rischio per infezione e malattia da CMV nel SOT.....	17
1.6 Clinica dell'infezione da CMV nel SOT.....	18
1.7 Terapia preventiva e profilassi.....	25
1.8 Diagnosi dell'infezione da CMV.....	28
2. SCOPO DELLO STUDIO.....	31
3. MATERIALE E METODI.....	33
3.1 Casistica.....	33
3.2 Metodi.....	34
3.3 Analisi Statistica.....	40
4. RISULTATI.....	41
4.1 Caratteristiche della popolazione.....	41
4.2 Casi di infezione primaria e riattivazione.....	42
4.3 Confronto dei dati ELISpot nei vari tipi di SOT.....	43
4.4 CMV-Avidity e CMV-IgG.....	45
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	47
BIBLIOGRAFIA.....	51

RIASSUNTO

Introduzione: Il citomegalovirus umano (CMV) costituisce una frequente causa di malattia e mortalità nei pazienti sottoposti a trapianto di organo solido (SOT). La ricostituzione dell'immunità cellulo-mediata specifica svolge un importante ruolo nel ridurre gli effetti dannosi di tale infezione.

Scopo: Confrontare il recupero dell'immunità cellulo-mediata CMV-specifica attraverso il test ELISpot nei pazienti adulti sottoposti a SOT (cuore, rene e fegato), al fine di standardizzare l'iter diagnostico e terapeutico e poter effettuare delle terapia su misura in base al livello individuale di rischio di infezione.

Metodi: Studio osservazionale su 209 pazienti adulti sottoposti a SOT (47 trapianti di cuore, 102 trapianti di rene e 60 trapianti di fegato). Tempo di osservazione 360 giorni dopo il trapianto. I parametri esaminati sono stati: test ELISpot, CMV-DNA con tecnica PCR Real Time, CMV-IgG e IgG-avidity.

Risultati: 1) i pazienti nefrotrapiantati recuperano l'immunità cellulo-mediata più lentamente rispetto ai pazienti con trapianto di cuore e fegato; 2) la ricostituzione dell'immunità cellulo-mediata specifica avviene più lentamente nei pazienti sieronegativi per CMV; 3) l'immunità umorale svolge un ruolo marginale nel controllo dell'infezione da CMV.

Conclusioni: l'utilizzo del test ELISpot permetterebbe di individuare i pazienti a rischio di infezione da CMV e di ottimizzare il loro trattamento, evitando casi di infezione tardiva.

ABSTRACT

Background: Human cytomegalovirus (CMV) represents a common cause of morbidity and mortality in solid organ transplant (SOT) patients. The CMV specific cell-mediated immunity recovery plays an important role in reducing the harmful effects of CMV infection.

In this study we compared the recovery of cell-mediated immunity CMV-specific with the ELISpot assay in adult patients undergoing SOT (heart, kidney and liver), in order to standardize the diagnostic and therapeutic process and be able to make therapy tailored based on the individual level of risk of infection.

Methods: Observations from 209 adult patients undergoing SOT (47 hearts, 102 kidneys 60 livers) during the first year 6 after transplantation. The parameters examined were: ELISpot test, CMV-DNA by PCR Real Time, CMV-IgG and IgG-avidity.

Results: 1) in kidney transplants the recovery of cell-mediated immunity CMV-specific is slower than hearts and livers; 2) the recovery of cell-mediated immunity CMV-specific is slower in patients CMV R-; 3) humoral immunity plays a marginal role in the control of infection by CMV.

Conclusion: the use of ELISpot assay could help identify patients at risk of CMV infection and optimize their treatment, avoiding cases of late infection.

1. INTRODUZIONE

1.1 Il trapianto di organo solido (SOT)

I trapianti di organo solido rappresentano oggi un'azione terapeutica concreta che offre prospettive di durata e qualità della vita a pazienti affetti da patologie non altrimenti curabili con terapie convenzionali.

I trapianti si distinguono in:

- trapianti singenici (isotrapianti): effettuati tra individui differenti ma geneticamente identici, come ad esempio due gemelli omozigoti, piuttosto rari nelle casistiche mondiali;
- trapianti allogenici (allograpianti): quelli eseguiti tra due soggetti geneticamente diversi ma appartenenti ad una stessa specie, per esempio fratello-sorella, genitore-figlio o tra non consanguinei. La maggioranza dei trapianti d'organo è rappresentata da trapianti allogenici.

Fin dall'antichità, l'umanità è sempre stata affascinata dall'idea di poter trasferire parti di tessuti od organi da un soggetto ad un secondo, sia a scopo curativo che nell'illusione di migliorarne caratteri somatici e psicologici. Tuttavia, ad eccezione di alcuni casi di trapianto di tessuti non viscerali (denti, ossa, pelle) di cui si hanno prove a partire dall'Età del Bronzo, i primi studi e tentativi sul trapianto di organo solido risalgono all'inizio del XX secolo, soprattutto grazie alla messa a punto di efficaci tecniche di anastomosi, che permettevano di connettere l'organo trapiantato all'organismo del ricevente.

Tabella 1. Principali eventi nella storia della medicina dei trapianti

Anno	Evento
1902	Primi esperimenti di auto-, allo- e xenotrapianto in animali ad opera di Ulman.
1906	Carrel mette a punto della tecniche per anastomosi vascolari.
Anni '20	Williamson intuisce che il fallimento di trapianti allogenici e dovuto ad incompatibilità biologiche tra donatore e ricevente.
1936	Voronoj effettua il primo trapianto allogenico di rene nell'uomo.
1954	Murray esegue con successo il primo trapianto di rene singenico.
1958	Dausset individua il primo antigene umano leucocitario, HLA-A2.
1959	Primo allotrapianto con TBI del ricevente.
Anni '60	Primi studi sull'impiego di farmaci immunosoppressori chimici (azatioprina, prednisone) e biologici (ALG).
1977	Borel scopre le proprietà immunosoppressive della ciclosporina. (Toledo-Pereyra and Palma-Vargas 1999, 2945-2948; Linden 2009, 165-184)

I miglioramenti in campo chirurgico misero presto in evidenza la presenza di una barriera immunologica che impediva il successo dell'intervento: nei vari esperimenti si assisteva infatti ad un'iniziale attività dell'organo trapiantato, seguita più o meno rapidamente da un generale ed irreversibile deterioramento dello stesso.

Intuito che la barriera immunologica doveva avere natura genetica, intorno al 1950 le ricerche si concentrarono su coppie di gemelli identici, nei quali si registrarono diversi successi in interventi di innesto di pelle. Il 23 dicembre 1954, il gruppo guidato da Joseph Murray eseguì il primo trapianto di rene tra due coppie di gemelli omozigotici, Ronald and Richard Herrick. Il successo dell'intervento gli valse nel 1990 l'assegnazione del Premio Nobel per la Medicina. L'entusiasmo creatosi all'interno della comunità medica, incentivò nuovi studi e ricerche per l'ottimizzazione dei trapianti allogenici (1).

Contemporaneamente, l'immunologia identificava gli antigeni umani leucocitari (HLA, Human Leukocyte Antigen), costituenti il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC, Major Histocompatibility Complex) e i meccanismi biologici coinvolti nell'attivazione della risposta immunitaria e nel rigetto dei trapianti. Si comprese la necessità dell'immunosoppressione nel trapianto allogenico, che venne inizialmente ottenuta mediante irradiazione totale del corpo (TBI, Total Body Irradiation) e quindi con terapie farmacologiche. In particolare, l'introduzione della ciclosporina, nei primi anni '80, nelle terapie immunosoppressive aumentò il tasso di sopravvivenza ad un anno dal trapianto dal 40% all'80% (2). Negli ultimi anni, l'impiego combinato di farmaci diversi ed anticorpi monoclonali e policlonali hanno permesso di ottimizzare la terapia immunosoppressiva, riducendone alcuni effetti collaterali (3).

Il trapianto è oggi divenuto una realtà terapeutica affermata nel caso di gravi patologie e tuttavia non è esente da alcune problematiche, come la carenza di organi, l'allungamento dei tempi di attesa e, non da ultimo, la prolungata necessità di terapia immunosoppressiva, predisponente ad infezioni opportunistiche.

1.2 Infezioni nel periodo post-trapianto

Una delle maggiori e più gravi complicanze è rappresentata dalle infezioni post-trapianto. La loro alta frequenza si accompagna spesso a difficoltà nella diagnosi, dal momento che i sintomi sono solitamente comuni, come

la febbre, che può risultare da cause non infettive, quali ad esempio il rigetto. È stato osservato che le infezioni sintomatiche dipendono dall'esposizione a determinati patogeni e soprattutto dallo stato generale di immunodepressione. Per quanto riguarda l'esposizione epidemiologica, si può distinguere tra infezioni nosocomiali, opportunistiche ed acquisite in comunità. Ad influire invece sulla condizione immunodepressa sono diversi fattori, principalmente i seguenti:

- la dose, la durata e la sequenza temporale con cui vengono impiegati i diversi farmaci;
- complicazioni tecniche relative all'intervento;
- presenza o assenza di infezioni da parte di germe/virus con proprietà immunomodulanti (4).

E' inoltre possibile un ulteriore distinguo, basato sulla trasmissione dell'infezione: può derivare dall'organo trapiantato, qualora il donatore ne fosse stato precedentemente affetto, o dal ricevente nel caso di riattivazione di infezioni latenti. Nonostante l'importanza dell'esposizione ambientale al patogeno sia essenziale perché si verifichi l'infezione, un ruolo certamente preponderante è ricoperto dall'immunodepressione indotta dai farmaci.

I principali agenti patogeni responsabili di malattia nel periodo post-trapianto sono infatti specie batteriche, fungine, virali e parassitarie che normalmente non causano malattia in un soggetto immunocompetente. Un sistema immunitario integro e infatti, nella maggior parte dei casi, efficiente per contenere e controllare l'infezione.

In base alle precedenti classificazioni, è possibile ricostruire la sequenza temporale delle infezioni (Figura 1). Il fatto che esse si presentino con un pattern temporale prevedibile agevola infatti la loro diagnosi e permette l'applicazione di terapie profilattiche mirate.

Per praticità, si distinguono tre intervalli temporali nel periodo post-trapianto.

- Primo periodo. Solitamente nei primi 30 giorni successivi al trapianto, le infezioni che si presentano con maggior frequenza sono di natura nosocomiale, sostenute da batteri gram-negativi o da *Candida* spp. che colonizzano cateteri e ferite. Raramente possono verificarsi casi di infezione disseminata da Herpes Simplex di tipo 1 o 2 (HSV-1, -2), che derivano dall'organo trapiantato.

- Secondo periodo . Dal primo al sesto mese post-trapianto, intervallo in cui la terapia immunosoppressiva è stabile, le infezioni sono sostenute soprattutto da patogeni opportunisti, di varia natura. Tra gli altri, infezioni e riattivazioni di Herpesvirus, alcuni dei quali con proprietà immunomodulanti (citomegalovirus [CMV], Virus di Epstein-Barr [EBV]), predispongono ad infezioni da *Listeria monocytogenes*, *Nocardia* spp., *Aspergillus* spp., *Toxoplasma gondii*, etc.

- Terzo periodo. Dopo sei mesi dall'intervento, se la risposta al trapianto nel ricevente è positiva, la terapia immunosoppressiva viene ridotta e le infezioni che possono insorgere sono soprattutto di tipo respiratorio ed acquisite in comunità.

Alcuni pazienti, tuttavia, presentano infezioni croniche virali, sostenute soprattutto da CMV, EBV e Papillomavirus (HPV), che danneggiano l'organo trapiantato e che possono essere responsabili anche di condizioni maligne, come disordini linfoproliferativi (sostenuti da EBV) e tumori (indotti da HPV).

Infine, una minoranza dei pazienti può presentare infezioni ricorrenti da parte di batteri e funghi opportunisti nonostante il regime immunosoppressivo sia più blando. Questi soggetti devono essere monitorati e sottoposti ad una prolungata profilassi antibatterica e antifungina (4).

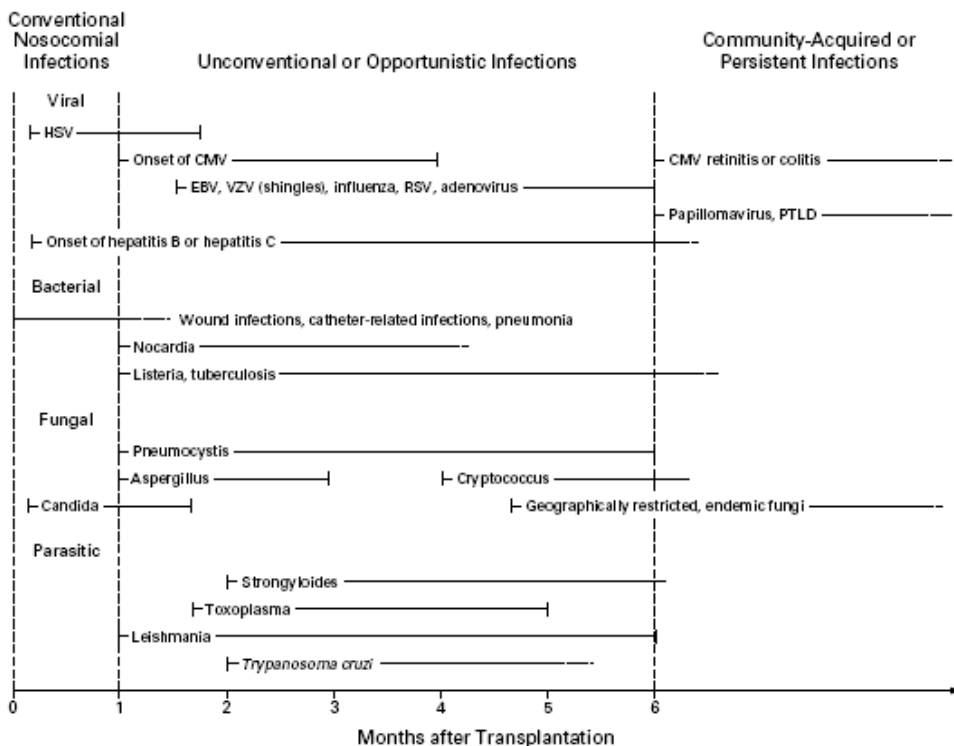


Figura 1 - Sequenza temporale delle infezioni più frequenti successive al trapianto (Fishman and Rubin 1998, 1741-1751).

1.3 Il Citomegalovirus umano (CMV)

Il Citomegalovirus umano (CMV), noto precedentemente come HHV5, è uno dei più complessi virus erpetici che infetta la specie umana appartenenti alla famiglia Herpesviridae, sottofamiglia Betaherpesvirinae (5)

Il suo nome è dovuto al tipico effetto citopatico che induce nelle cellule infettate: queste infatti tendono ad aumentare di volume e a diventare molto grandi prima di andare incontro a lisi (6).

La sua prima descrizione come agente patogeno causa di infezione in un adulto in salute è avvenuta nel 1965.

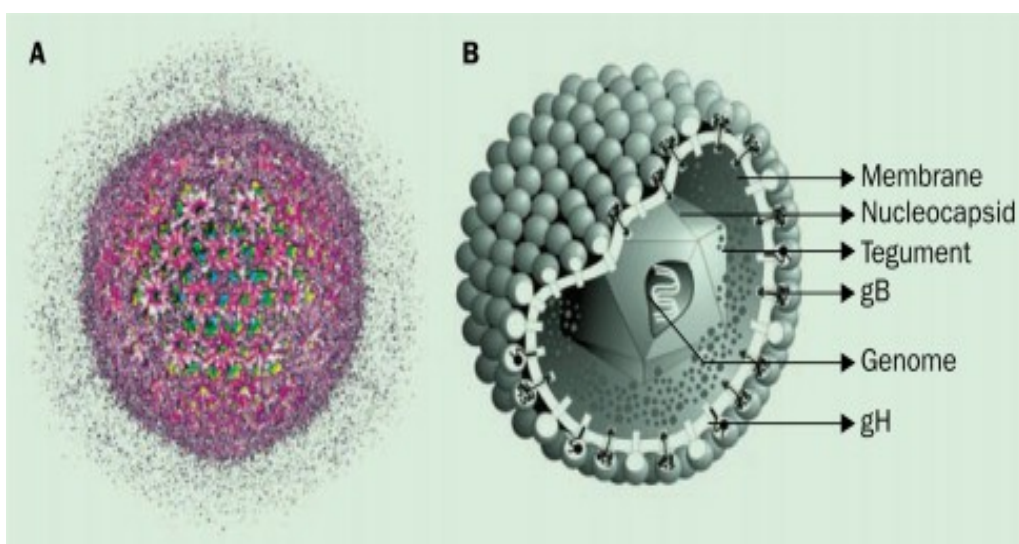


Figura 2 - Citomegalovirus umano. (A) rappresentazione della porzione icosaedrica.
(B) Modello tridimensionale del virione di CMV (Gandhi e Khanna 2004)

CMV è il virus che dal punto di vista strutturale presenta il diametro maggiore rispetto agli altri herpesvirus, fino a 250 nm, e il genoma più grande, 240 kbp. Come gli altri membri della famiglia, presenta un capsidico icosaedrico di 162 capsomeri ognuno dei quali in sezione trasversale è un

esagono cavo, un tegumento elettron-denso circondato da un envelope di natura lipoproteica in cui sono localizzate le glicoproteine che fungono da recettore. In particolare le glicoproteine B e H (gB e gH) svolgono un ruolo preminente nella fase di adesione e penetrazione del virus nella cellula ospite. Il suo genoma è costituito da una doppia catena a DNA, contenente approssimativamente 160 open reading frames (ORF); una porzione molto grande del genoma codifica proteine coinvolte nell'invasione della cellula, nell'interferenza con la risposta immunitaria dell'ospite o nell'interazione con i mediatori infiammatori allo scopo di facilitare la sua permanenza e disseminazione nell'ospite (7). L'organizzazione e la struttura del DNA genomico sono simili a quelle del virus dell'Herpes Simplex (HSV), in quanto le sequenze singole a lunga catena sono fiancheggiate da segmenti ripetitivi alle loro estremità.

Dopo l'infezione primaria, il genoma di HCMV persiste nell'ospite come episoma in forma latente. Sebbene le sedi di latenza non siano ancora state definite con certezza, le cellule endoteliali, i leucociti del sangue periferico (i monociti in particolare) e i precursori ematopoietici rappresentano un serbatoio da cui il virus può riattivare in particolari situazioni, quali ad esempio la compromissione del sistema immunitario, il trapianto d'organo e l'infezione da HIV (7)

Il ciclo vitale del CMV è conforme per molti aspetti al classico modello replicativo degli altri herpesvirus, nonostante abbia caratteristiche peculiari, dovute soprattutto alla grandezza del genoma.

Alla penetrazione del virus nell'organismo segue la disseminazione per via ematogena di vari organi e tessuti. Nel sangue CMV è veicolato dai leucociti, nei tessuti le cellule infettate hanno un aspetto tipico, diventando più grandi, "citomegaliche", e con inclusioni nucleari e citoplasmatiche. Queste cellule sono state descritte in numerosi organi, ed in particolare nelle ghiandole salivari, in polmone, fegato, reni, surreni, vie digerenti, SNC, pancreas. La risposta infiammatoria dell'ospite si traduce nella comparsa di plasmacellule e linfo-monociti; in qualche caso si sviluppa una reazione granulomatosa nel fegato.

L'infezione da CMV è strettamente specie-specifica, sia in vivo che in vitro, ed è caratterizzato da un ciclo replicativo in vivo tra le 12 e le 24 ore, a seconda dello stato immunitario dell'ospite. La sede della replicazione virale è il nucleo delle cellule infettate, dove interviene la trascrizione virale ad opera della RNA polimerasi cellulare. L'espressione del genoma virale avviene in tre fasi, in cui sono espressi dapprima i geni precocissimi (geni alfa, per le proteine non strutturali), poi i geni precoci (geni beta, per le proteine precoci tra cui la DNA polimerasi per sintesi del DNA virale) ed infine i geni tardivi (geni gamma, per le proteine strutturali). Le proteine strutturali si assemblano quindi a formare il capsido nel nucleo della cellula infetta: l'accumularsi di queste particelle è responsabile della caratteristica inclusione ad "occhio di gufo" apprezzabile a livello nucleare nelle cellule infette. L'acquisizione di tegumento ed envelope avvengono rispettivamente a livello citoplasmatico e nell'apparato di Golgi. Il virione maturo sfrutta

quindi il traffico vescicolare del Trans-Golgi Network per arrivare alla membrana plasmatica ed essere rilasciato nel mezzo extracellulare (5).

1.4 La risposta immunitaria verso CMV

L'esito dell'infezione da CMV è determinata da una complessa interazione tra ospite e virus, dove sussiste da una parte la capacità dell'ospite di creare una risposta immunitaria efficace contro il virus e dall'altra l'abilità del patogeno di evadere la risposta dell'ospite. La variabilità della risposta dell'ospite tra i vari individui, e probabilmente anche tra i vari genotipi virali, aumenta la complessità di tale interazione.

La risposta immune contro l'infezione da CMV può essere divisa in due grandi categorie: la risposta antivirale umorale e la risposta immunitaria cellulo-mediata. In molte situazioni è probabile che la resistenza all'infezione e la guarigione dalla malattia richiedano entrambe, poiché entrambe svolgono un ruolo specifico in diverse fasi dell'infezione. Entrambe infatti limitano la produzione di virioni e dunque proteggono dall'infezione i tessuti e le cellule non ancora colpite: le cellule effettrici controllano la replicazione virale nelle cellule infettate diminuendo la virulenza, mentre gli anticorpi antivirali limitano la disseminazione per contiguità o per via ematogena alle cellule non infettate (8).

Risposta immunitaria innata

Le cellule Natural Killer (NK) svolgono un ruolo di importanza cruciale nella risposta immunitaria rivolta contro CMV, in particolare nelle prime

fasi dell'infezione prima che avvenga l'attivazione dei linfociti T (CTL). Le cellule NK risultano responsive, in maniera non specifica, nei confronti di un'alterata espressione di particolari molecole di superficie, in particolare dell'MHC di classe I, presente nella membrana delle cellule infettate dal virus. Cellule esprimenti un basso numero di MHC di classe I risultano essere suscettibili al riconoscimento e subiscono una risposta di tipo citolitico, attraverso il rilascio di perforine e granzimi, o mediata da citochine (IFN- γ) (9). Quest'azione permette inoltre alle cellule partecipanti alla risposta immunitaria adattativa di svilupparsi in un contesto ricco di stimoli di proliferazione e maturazione (10). La produzione di IFN- α e IFN- β costituisce, inoltre, una componente essenziale della risposta immunitaria innata nei primi stadi dell'infezione (11).

Risposta immunitaria umorale

Gli anticorpi rivolti contro CMV rappresentano una delle componenti dell'immunità adattativa e contribuiscono alla neutralizzazione dell'infezione virale in diversi modi. Durante l'infezione primaria vengono prodotti numerose immunoglobuline rivolte contro proteine strutturali del tegumento (ad es. pp65 o ppUL83), glicoproteine dell'envelope (ad es. gB, gH e i complessi multimerici gH/gL) e proteine non strutturali (ad es. IE1). Il ruolo degli anticorpi risulta essere cruciale nell'impedire la disseminazione del virus e nel minimizzare gli effetti dell'infezione. Possono infatti legarsi a virioni liberi impedendone l'adesione sulle cellule dell'ospite e la successiva penetrazione, la perdita del coat, danneggiando

l'envelope e bloccando i recettori virali. Gli anticorpi sono inoltre in grado di riconoscere cellule infettate dal virus e risultano quindi essere coinvolti nella citotossicità mediata da complemento e da immunoglobuline.

L'avidità anticorpale costituisce inoltre un importante parametro a fini diagnostici poiché permette l'associazione del rischio con la tipologia di infezione. In infezioni primarie l'avidità risulta essere più bassa e la paziente possiede, conseguentemente, un rischio decisamente maggiore di trasmissione materno-fetale dell'infezione (9).

Risposta immunitaria cellulo-mediata

La risposta immunitaria cellulo-mediata ricopre una funzione di primaria importanza nella protezione dell'organismo ospite (12). I linfociti T citotossici (CTL) possiedono la capacità di lisare le cellule infettate da CMV prima della produzione della progenie virale, riconoscendole attraverso l'interazione tra le molecole MHC di classe I, leganti peptidi virali, e il loro T cell receptor (TCR). Diversi studi effettuati in modelli murini hanno permesso di comprendere il ruolo cruciale svolto da questa tipologia cellulare. Anche i linfociti T helper svolgono un ruolo importante nella risposta contro il virus poiché mantengono costante l'azione dei CTL. L'azione dei linfociti T permette dunque di controllare e circoscrivere l'infezione virale (9).

1.5 Fattori di rischio per infezione e malattia da CMV nel SOT

L'incidenza dell'infezione da CMV varia a seconda dell'organo trapiantato, il tipo di immunosoppressione usato e il livello di immunità per CMV nei riceventi. In generale, i trapianti di fegato, pancreas, polmone, intestino e cuore hanno una maggiore incidenza di malattia da CMV rispetto al rene.

I primi fattori che vanno considerati nella stratificazione del rischio per infezione da CMV sono la sierologia per CMV del donatore (D) e quella pre-trapianto del ricevente (R): in particolare il rischio di infezione è maggiore nei trapianti D+/R-, intermedio quando il ricevente ha sierologia positiva (a donatore positivo o negativo indifferentemente), minore nei trapianti D-/R-. Il regime immunosoppressivo ha poi un valore rilevante: si è stimato infatti un aumento dell'incidenza dell'infezione da CMV con l'uso del micofenolato mofetile nel trapianto di rene rispetto all'uso della ciclosporina, e nel caso di terapia di induzione con agenti anti-linfocitari il rischio di infezioni severe è aumentato sensibilmente. Al contrario gli inibitori di mTOR hanno mostrato una possibile riduzione del rischio di viremia.

Altri fattori che aumentano il rischio di infezione sono: il rigetto e il conseguente potenziamento della terapia immunosoppressiva; altre infezioni virali; fattori immunologici quali l'HLA mismatch, correlato anche ad un aumento dell'immunosoppressione; re-trapianto; complicanze chirurgiche quali l'insufficienza epatica fulminante e la trombosi dell'arteria epatica nel caso del trapianto di fegato (13).

La relazione tra quantità di CMV presente nel sangue e lo sviluppo di malattia sintomatica è nota dal 1975. Successivamente numerosi studi hanno dimostrato che la viremia è un importante fattore di rischio per lo sviluppo di malattia da CMV ed un utile indicatore prognostico nei riceventi di SOT. Successivi dati hanno confermato che il ritardo o l'assenza nella clearance del virus sono importanti elementi predittivi di recidiva di malattia. Un basso livello replicativo sembra predisporre maggiormente alla progressione verso la malattia da CMV rispetto ad una situazione caratterizzata da picchi di replicazione virale. Le evidenze suggeriscono quindi che i bassi livelli di replicazione virale non costituiscono protezione ma possono predisporre a progressione o recidiva di malattia da CMV (8).

1.6 Clinica dell'infezione da CMV nel SOT

Il CMV è causa frequente di malattia e mortalità nei pazienti sottoposti a trapianto di organo solido. Come semplificato nella figura 3, CMV può causare una varietà di sindromi cliniche di per se stesso, può predisporre a severe superinfezioni fungine o batteriche, e può potenziare una eventuale disfunzione dell'organo trapiantato. L'insorgenza di queste complicanze corrisponde temporalmente alla viremia di CMV, all'escrezione e alla sieroconversione, usualmente da 1 a 4 mesi dopo il trapianto.

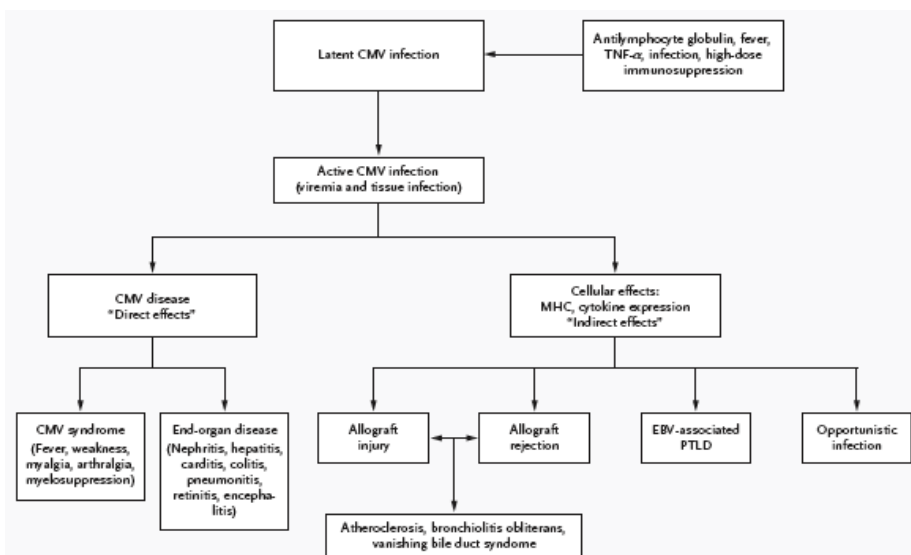


Figura 3 - Infezione da CMV in pazienti trapiantati d'organo solido: effetti diretti ed indiretti (Fishman 2007, 2601-2614).

È stato osservato che più del 75% dei soggetti va incontro ad infezione primaria, riattivazione o superinfezione (14) e di questi, il 30% manifesta malattia sintomatica (15) nei mesi successivi all'intervento.

Le conseguenze dell'infezione da CMV nel paziente trapiantato d'organo solido si dividono in due categorie: gli effetti diretti, positivamente correlati con la carica virale, e indiretti, imputabili alle proprietà immunomodulanti del virus. Gli effetti diretti dell'infezione virale comprendono la sindrome simil-mononucleosica da CMV e la malattia terminale d'organo. Nella patologia invasiva, che nel paziente trapiantato si verifica con maggior frequenza e gravità a carico dell'organo impiantato, si ha la distruzione del tessuto colpito per effetto della lisi cellulare conseguente all'infezione e anche a causa della risposta immunitaria dell'organismo.

Gli effetti indiretti sono dovuti alla capacità di CMV di interferire con il sistema immunitario dell'ospite.

L'infezione da CMV nel paziente trapiantato è definita come l'isolamento del virus dal paziente o dal riscontro di una sieroconversione. Ciò si verifica più comunemente nei primi 3 mesi dal trapianto, con un picco di incidenza nella terza/quarta settimana, in assenza di profilassi antivirale.

Nei pazienti trapiantati si assiste a 3 tipologie di infezione da CMV:

1) infezione primaria: avviene quando un paziente sieronegativo per CMV riceve un organo da un donatore sieropositivo (D+/R-), e quindi sviluppa infezione primaria.

2) riattivazione: avviene quando un virus latente in un paziente sieropositivo prima del trapianto si riattiva a causa dell'immunosoppressione o dello stimolo antigenico allogenico dopo il trapianto (D+/R+ e D-/R+).

3) superinfezione: avviene quando si assiste alla crescita di un ceppo diverso di CMV in un paziente già sieropositivo; tale ceppo viene acquisito dall'organo trapiantato o da trasfusioni di sangue.

L'infezione non esita sempre in malattia da CMV, suggerendo che il sistema immunitario può controllare l'infezione in alcuni pazienti.

La malattia da CMV viene definita come una infezione sintomatica, e può manifestarsi con un corredo di segni e sintomi noti come "sindrome da CMV" o con il coinvolgimento di un singolo organo (evidenza istologica di effetto citopatico virale o coltura positiva per CMV da un campione di

tessuto profondo nel contesto di manifestazioni cliniche suggestive). Lo specifico coinvolgimento d'organo frequentemente corrisponde all'organo trapiantato e varia a seconda del tipo di trapianto.

Dal punto di vista temporale, nel paziente trapiantato, il rischio di infezione da CMV aumenta a partire dal primo mese successivo al trapianto e decresce con la riduzione del regime immunosoppressivo. Tuttavia, si registrano anche casi di pazienti che presentano l'insorgenza della cosiddetta malattia tardiva da Citomegalovirus, che si manifesta frequentemente nella forma di gastroenterite, colite, polmonite o retinite.

In letteratura si evidenzia come i principali fattori di rischio legati all'insorgenza di questa patologia siano i seguenti:

- stato sierologico del paziente (rischio maggiore per i soggetti D+/R sottoposti a profilassi antivirale);
- il regime immunosoppressivo a base di OKT3 o mofetil micofenolato (16);
- alta carica virale negli stadi iniziali dell'infezione e persistenza di bassi livelli di replicazione virale;
- coinfezioni da parte da altri virus erpetici (Herpesvirus umano di tipo 6 [HHV-6] e di tipo 7 [HHV-7]) (17);
- infezione da parte di ceppi di CMV ganciclovir-resistenti;
- rigetto acuto.

Negli ultimi anni, l'adozione di terapie immunosoppressive più potenti e di strategie antivirali che impediscono e ritardano la riattivazione virale nel

tempo hanno portato ad un aumento dell'incidenza di questa patologia. L'importanza epidemiologica della malattia tardiva da CMV è legata al problema della tempestività della diagnosi, dal momento che essa ha un esordio subdolo e si manifesta in periodi in cui solitamente il paziente trapiantato è sottoposto ad un monitoraggio virologico meno stringente.

CMV e trapianto di rene

l'incidenza di infezione di CMV nel trapianto di rene è del 30-60%, mentre la malattia si osserva nell'8-10% dei casi. Quest'ultima si manifesta solitamente nelle prime 12 settimane dopo il trapianto.

La presentazione clinica più frequente della malattia da CMV è data dal coinvolgimento d'organo, solitamente in forma di polmonite o di interessamento gastrointestinale.

Un quadro peculiare è la glomerulopatia CMV-correlata: caratterizzata da ipertrofia e necrosi delle cellule endoteliali, restringimento od obliterazione dei lumi capillari, accumulo di materiale fibrillare nei capillari glomerulari, infiltrati di cellule mononucleate senza anomalie tubulari (18). Visto il riscontro di anticorpi anti-CMV a livello dei capillari glomerulari, si è ipotizzato che l'infezione da CMV possa dar luogo a forme diverse di danno glomerulare, mediato dalla risposta cellulare T. E' stata anche descritta una forma tubulo-interstiziale di malattia con atrofia tubulare e infiltrato mononucleare interstiziale, che sembra derivare da un effetto citopatico diretto di CMV.

Infine è noto che vi sia una correlazione nel trapianto di rene tra infezione

da CMV e rigetto. Il meccanismo alla base di tale evento sembra essere un aumento del rilascio citochinico stimolato dall'infezione virale, con conseguente stimolo dell'espressione degli antigeni MHC e danno immuno-mediato.

CMV e trapianto di fegato

In assenza di terapia profilattica, l'incidenza di infezione da CMV nei paziente trapiantati di fegato va dal 23% all'85%, circa il 50% di essi sviluppa malattia clinica. L'infezione si osserva solitamente tra la terza e la quarta settimana dopo il trapianto e il graft è il sito maggiormente coinvolto. L'epatite da CMV è caratterizzata da un profilo biochimico di tipo colestatico. La biopsia epatica è necessaria per la diagnosi e dimostra la presenza di microascessi o microgranulomi e occasionali infiltrati infiammatori nella triade portale. Altre manifestazioni cliniche sono la polmonite, l'interessamento gastrointestinale e la corioretinite. La malattia da CMV tardiva può invece essere associata ad insufficienza epatica fulminante, infezioni virali ricorrenti (da HCV, HHV6 e HHV7) e al rigetto. Si è dimostrato che la malattia da CMV nel paziente trapiantato di fegato è associata ad un tasso di mortalità più alto ad un anno, ad un aumento dei costi e a tempi di ospedalizzazione più lunghi nel primo anno. Inoltre un precedente episodio di malattia da CMV è correlato ad un maggior rischio di perdita del graft a 3 anni (19).

CMV e trapianto di cuore e cuore-polmone

Nel trapianto di cuore e cuore-polmone le infezioni costituiscono la più

importante causa di morte nel primo anno dopo il trapianto e CMV la causa più comune.

Nel trapianto di polmone la manifestazione clinica più osservata è la polmonite; l'assenza dei riflessi della tosse, la diminuita clearance mucocigliare delle secrezioni bronchiali e l'anormale interazione tra i linfociti circolanti dell'ospite, i macrofagi del donatore e le cellule dendritiche dell'organo trapiantato sono la probabile causa di interessamento del graft (20).

Nel paziente trapiantato di cuore la presentazione clinica tipica è la miocardite da CMV. In questi pazienti inoltre l'infezione virale sembra essere correlata ad una più rapida evoluzione del rigetto cronico, caratterizzato dallo sviluppo di aterosclerosi vascolare del graft (allograft vascular disease); si ipotizza che l'infezione alteri la produzione di fattori di crescita, portando alla proliferazione cellulare e dunque ad un danno immuno-mediato che può alterare anche la alloantigenicità, portando al rigetto (21).

Nei paziente con trapianto di cuore e polmone inoltre è possibile osservare un quadro di retinite dopo 6 mesi dal trapianto, solo in paziente con danno microvascolare dovuto a comorbidità, quali diabete, ipertensione arteriosa severa e fumo; tale patologia può divenire lentamente evolutiva e può essere bilaterale.

1.7 Terapia preventiva e profilassi

Per il trattamento delle infezioni da CMV nei pazienti trapiantati di organo solido sono attualmente disponibili i seguenti farmaci: ganciclovir (GCV), valganciclovir (VGCV) e foscarnet (PFA).

Il ganciclovir è un analogo sintetico della 2-deossiguanosina. Una volta assunto, il farmaco è prima fosforilato da una fosfotransferasi virale, codificata dal gene UL97, e quindi subisce una seconda reazione di fosforilazione da parte di chinasi cellulari, venendo convertito nella forma trifosfato.

La forma attiva del farmaco inibisce selettivamente la DNA polimerasi virale (codificata dal gene UL54), impedendo l'incorporazione del nucleotide dGTP e provocando il blocco forzato della replicazione del DNA virale.

È disponibile anche un pro-farmaco del ganciclovir, il val-ganciclovir, che può essere assunto per via orale garantendo gli stessi livelli di efficacia con una migliore biodisponibilità.

I due farmaci condividono i medesimi effetti collaterali: l'assunzione prolungata è causa di nefrotossicità e neutropenia. Per questo motivo, la dose somministrata ai pazienti trapiantati di rene deve essere correttamente bilanciata in modo da non compromettere le funzioni d'organo né predisporre il paziente ad un maggior rischio di infezioni opportunistiche.

Il foscarnet è un inibitore non nucleosidico della DNA polimerasi virale: è un analogo del pirofosfato, di cui occupa il sito di scambio presente a

livello dell'enzima espresso da CMV. Analogamente a GCV e VGCV, quindi anche il foscarnet causa il blocco della replicazione virale. Esso trova impiego come farmaco di seconda linea nel trattamento delle infezioni sostenute da ceppi ganciclovir-resistenti di CMV. I principali effetti collaterali del farmaco sono la nefrotossicità e l'alterazione dell'equilibrio elettrolitico; inoltre presenta lo svantaggio di dover essere assunto per via endovenosa.

Infine, un'ulteriore scelta terapeutica, solitamente impiegata in associazione con i farmaci già descritti, è rappresentata dalla somministrazione di immunoglobuline iperimmuni CMV-specifiche. Nonostante il loro ruolo nella risoluzione dell'infezione non sia stato ancora chiarito, diversi studi clinici hanno dimostrato come il loro utilizzo contribuisca a ridurre l'incidenza della malattia tardiva da Citomegalovirus nei pazienti D-/R+; si presume che la loro azione si espliciti attraverso il meccanismo dell'ADCC.

La terapia farmacologica diretta contro Citomegalovirus umano può essere sostenuta in tre differenti modalità:

- (a) trattamento terapeutico, in caso di malattia in atto;
- (b) profilassi, applicata ad un'intera popolazione di pazienti a maggior rischio di infezione (es D+/R-);
- (c) trattamento o terapia preventiva (preemptive therapy), applicata ai pazienti a moderato rischio di malattia (es D+/R+ e D-/R+) (22).

Mentre l'applicazione del trattamento terapeutico è sempre successiva alla diagnosi di malattia da CMV, la profilassi e la terapia preventiva hanno il

fine di impedirne l'insorgenza.

La terapia profilattica viene applicata ai pazienti a maggior rischio di infezione da CMV, ovvero quei soggetti sieronegativi riceventi da donatore positivo (D+/R-). Essa prevede la somministrazione continua per i primi 100 giorni successivi al trapianto di farmaci antivirali, solitamente ganciclovir per via endovenosa od orale o valganciclovir.

Molti sono gli elementi a favore del regime di profilassi:

- diminuzione dell'incidenza di infezione e malattia da CMV
- protezione da altri herpes virus (HSV e VZV)
- apparente diminuzione degli effetti indiretti di CMV e degli altri herpesvirus.

Anche se la profilassi ha ridotto l'incidenza di infezione e anche di malattia da CMV, una parte dei pazienti va incontro ad una malattia tardiva, a causa del mancato sviluppo di immunità protettiva per CMV indotto dal farmaco. Inoltre alcuni studi hanno dimostrato che il trattamento profilattico prolungato (< 3 mesi) con ganciclovir orale ha determinato lo sviluppo di infezione da ceppi virali resistenti nel 10% dei pazienti.

La terapia preventiva (preemptive therapy), solitamente applicata a soggetti già sieropositivi per CMV, consiste nella somministrazione di farmaci antivirali a pazienti con infezione agli stadi iniziali. Questa strategia richiede il monitoraggio continuo del paziente. Studi retrospettivi hanno determinato i valori limite, al di sopra dei quali viene iniziata la somministrazione di farmaci antivirali. L'esposizione del paziente a bassi

livelli di replicazione ha il vantaggio di portare alla stimolazione del sistema immunitario ed ad una migliore ricostituzione immunitaria antivirale. Inoltre, ulteriori vantaggi sono rappresentati dalla riduzione del periodo di somministrazione di farmaci, con minor rischio di tossicità e di selezione di ceppi resistenti al ganciclovir. Tuttavia, mentre l'efficienza nel prevenire la malattia da CMV è ottima, la terapia preventiva non è efficace nell'evitare gli effetti indiretti dell'infezione da Citomegalovirus, che non dipendono dalla carica virale, ma solamente dallo stato attivo di replicazione virale.

In conclusione, la strategia preventiva risulta migliore nel prevenire la malattia da CMV, soprattutto ad insorgenza tardiva, e nel favorire la ricostituzione dell'immunità virus specifica, ma presenta ancora esiti insoddisfacenti nel ridurre l'incidenza di rigetto acuto e cronico (22, 23).

1.8 Diagnosi dell'infezione da Citomegalovirus

Gli avanzamenti in ambito tecnologico hanno permesso lo sviluppo di test diagnostici basati su diversi aspetti dell'interazione virus/ospite, ed in particolare la ricerca del virus, la ricerca di componenti virali, oppure la risposta immune virus-specifica sia umorale che cellulo-mediata.

Il gold standard nella diagnosi di infezione da CMV è la coltura virale, facilmente eseguibile su fibroblasti umani; il tempo richiesto per la sua esecuzione rende impossibile l'applicazione del test nella pratica clinica.

I test di rilevazione delle componenti virali correntemente utilizzati per la

diagnosi di infezione e malattia da CMV sono il saggio dell'antigenemia per pp65 (ormai in disuso) e la valutazione della DNAemia (attualmente saggio maggiormente utilizzato).

Antigenemia per pp65: è un saggio a immunofluorescenza che determina quantitativamente la frazione di leucociti di sangue periferico positivi per la fosfoproteina pp65 di CMV. Vista la dimostrata correlazione tra la positività dei linfociti per pp65 e l'infezione da CMV in atto, tale test è stato utilizzato per il monitoraggio del paziente trapiantato sottoposto a terapia preemptive. L'accuratezza del saggio è però inficiata da falsi negativi, relativi a pazienti neutropenici, e da falsi positivi, dovuti ad eventi di fagocitosi tardiva (24). Altri svantaggi sono inoltre l'elevato costo e la necessità di personale addestrato.

DNAemia: ricerca del DNA virale in un numero predeterminato di leucociti nel sangue periferico o in un definito volume di sangue. Attualmente viene valutata con metodica PCR Real Time. Questo test ha numerosi impieghi clinici nel follow-up del paziente trapiantato: monitoraggio delle infezioni da CMV, valutazione della efficacia del trattamento antivirale. Inoltre può essere condotto su altri tipi di liquidi biologici, quali urine, lavaggio broncoalveolare, saliva, liquido amniotico.

Sierologia per CMV: test di immunità umorale, costituisce l'approccio diagnostico di scelta nel documentare un pregresso contatto con il virus. Nei pazienti con SOT essa viene utilizzata per prevedere il rischio di infezione da CMV e per diagnosticare una infezione primaria nei pazienti

precedentemente sieronegativi; gioca invece un ruolo minore nella diagnosi di infezione da riattivazione. È possibile inoltre valutare l'avidità delle IgG per CMV. Bassa CMV IgG avidity (<20%), indicano un'esposizione recente al virus, mentre alti livelli di CMV IgG avidity correlano con una riattivazione virale .

I test di laboratorio per la quantificazione della risposta immunitaria linfocitaria sono:

Intracellular Cytokine staining (ICS): valuta, attraverso tecniche di citofluorimetria, la produzione di citochine, solitamente IFN- γ , prodotte a seguito dell'attivazione linfocitaria in risposta ad un antigene.

ELISpot: test immunoenzimatico che determina quantitativamente la risposta immunitaria cellulare, attraverso la misura della secrezione di diverse citochine.

Proliferazione cellulare CFSE-based: test che valuta, attraverso la citofluorimetria, la capacità delle cellule T di proliferare in seguito a stimolo antigenico.

Tetramer staining: test quantitativo, specifico, che valuta la presenza di cellule T-CD8 antigene-specifiche.

2. SCOPO DELLO STUDIO

Diversi studi hanno dimostrato il ruolo importante della ricostituzione dell'immunità T cellulare CMV-specifica nei SOT per frenare gli effetti dannosi dell'infezione da CMV.

Lo scopo di questo studio è di confrontare il recupero della immunità T-specifica per CMV attraverso il test ELISpot nei pazienti adulti sottoposti a SOT in follow-up presso i centri trapianto di cuore, fegato e rene dell'Ospedale Civile di Padova, al fine di standardizzare l'iter diagnostico e terapeutico nei vari tipi di SOT e di poter effettuare delle terapie “su misura”o “tailored” in base al livello individuale di rischio di infezione.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Casistica

Lo studio consiste in una analisi osservazionale trasversale su una popolazione di 209 pazienti adulti sottoposti a SOT in follow-up presso i centri trapianti di cuore (47 pazienti), fegato (60 pazienti) e rene (102 pazienti) dell' Ospedale Civile di Padova.

Sono stati considerati criteri di esclusione:

- il ritrapianto
- i trapianti tra donatore e ricevente entrambe sieronegativi (D-/R-)
- i pazienti con immunodeficienze preesistenti o acquisite.

Il tempo di osservazione è stato di 360 giorni dopo il trapianto. Durante tale periodo oltre al routinario monitoraggio della viremia con metodica PCR Real Time, considerata positiva per un valore superiore a 1000 copie/mL di sangue, sono stati eseguiti il saggio ELISpot per la valutazione della immunità T-cellulare, la sierologia per CMV (IgG) e il test di avidity per la valutazione della immunità umorale.

Queste misurazioni sono state eseguite ai tempi 0, 30, 60, 90, 180 e 360 giorni post-trapianto.

3.2 Metodi

3.2.1. CMV DNAemia

La CMV DNAemia è stata valutata mediante una reazione di PCR Real-Time quantitativa su sangue intero per una porzione di 137 bp del gene UL122 di CMV, codificante una proteina precocissima (IE-2). L'analisi, basata sulla misurazione dell'incremento della fluorescenza (tecnologia Taq-Man), è stata condotta su ABI Prism 7700 (Applied Biosystem), su campioni di DNA estratti da leucociti di sangue periferico. Sono stati utilizzati i seguenti primers e sonde:

- primer forward (CM-5T) TCATCCACACTAGGAGAGCAGACT;
- primer reverse (CM-3T) GCCAAGCGGCCTCTGAT;
- sonda ACTGGGCAAAGACCTTCATGCAGATCTC, contenente un reporter fluorescente (6-carbossifluoresceina, FAM) all'estremità 5' e un quencher (6-carbossi-tetrametil-rodamina, TAMRA) all'estremità 3'.

La reazione di amplificazione è stata effettuata secondo il seguente programma:

- 50°C per 2 minuti;
- 95°C per 5 minuti;
- 95°C per 15 secondi e 60°C per 1 minuto (per 40 cicli).

La concentrazione cellulare nel campione di partenza è stata confermata dalla parallela amplificazione di una porzione di 81 bp del gene codificante la β - globina, che serve anche da controllo positivo per la reazione di PCR.

La reazione di amplificazione ha impiegato i seguenti primers e sonde:

(d) primer forward AGGGCCTCACCACTT;

(e) primer reverse GCACCTGACTCCTGAGGAGAA;

(f) sonda 6-FAM-ATCCACGTTACCTTGCCCCACA-TAMRA.

La reazione è stata condotta secondo il medesimo programma utilizzato per l'amplificazione della porzione del gene UL122 di CMV.

3.2.2 Estrazione di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs)

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs, peripheral blood mononuclear cells) sono una popolazione cellulare eterogenea composta prevalentemente da linfociti e monociti. Per il loro isolamento si è utilizzato il metodo della centrifugazione con Ficoll Paque Plus (GE Healthcare). Il campione di sangue periferico, diluito in PBS 1X (8,1 g NaCl, 1,88 g Na₂HPO₄, 0,2 g KCl, 0,24 g KH₂PO₄, ddH₂O, pH 7.4) viene sottoposto a centrifugazione a 600 g per 20 minuti, senza freno, su Ficoll Paque Plus. In funzione della loro densità, eritrociti e granulociti sono in grado di attraversare la miscela di Ficoll e si sedimentano sul fondo, mentre i PBMCs si concentrano in corrispondenza dell'interfaccia tra sangue e Ficoll Paque Plus, da dove sono facilmente recuperabili. Durante questa fase viene anche prelevata un'aliquota di siero, su cui successivamente eseguire la valutazione dell'avidità delle immunoglobuline. Per eliminare eritrociti eventualmente presenti, le cellule mononucleate così ottenute sono state sottoposte ad un trattamento di lisi con ammonio cloruro, (8,3 g NH₄Cl, 1,0 g KHCO₃, 0,003 g EDTA, ddH₂O, pH 7.4) per 5 minuti, seguito da

centrifugazione a 250 g per 7 minuti; si è quindi eseguito un lavaggio in PBS 1X a 250 g per 7 minuti per allontanare residui di Ficoll e di ammonio cloruro. La conta cellulare dei PBMCs isolati è stata effettuata con la camera di Burker, quindi le cellule sono state risospese in terreno RPMI completo (RPMI 1640 [GIBCO, Invitrogen], 10% siero umano AB scomplementato (Sigma Aldrich (v/v)), 1% L-glutammina (2 mM, v/v), penicillina/streptomicina (50000 UI (p/v)), ciprofloxacina (4 mg/500 ml (v/v)). Alternativamente le cellule vengono risospese in soluzione di congelamento (10% DMSO in FBS) e prima conservate a -80°C utilizzando contenitori Criostep (Nalgene) che consentono una riduzione graduale della temperatura (-1°C/min), quindi preservate in azoto liquido.

3.2.3. IFN- γ ELISpot

Il test ELISPOT (Enzime-Linked ImmunoSpot) è una variante del saggio ELISA che permette di valutare la frequenza di cellule T antigene-specifiche basandosi sulla produzione di citochine. Questo test immunologico utilizza piastre di plastica rivestite sul fondo con membrana di polivinilidenecloruro (PVDF) su cui sono stati adsorbiti anticorpi specifici per la citochina di interesse. Su questa membrana vengono seminati PBMCs (Figura 4a). Alla piastra viene quindi aggiunto lo stimolo, che dopo processamento da parte delle APC attiva i linfociti T specifici per esso. Le cellule T rispondono all'attivazione con la secrezione della citochina di interesse, la quale viene legata dall'anticorpo di cattura sul fondo della

piastra, in corrispondenza della posizione della cellula T attivata (Figura 4b). Dopo 24 ore di incubazione, le cellule vengono rimosse e si aggiunge ad ogni pozzetto un anticorpo secondario specifico per la citochina (Figura 4c); la piastra viene quindi incubata in camera umida a temperatura ambiente e al buio per due ore. L'anticorpo aggiunto è coniugato all'enzima fosfatasi alcalina che, in presenza del substrato (BCIP/NBT, 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/ nitroblue tetrazolium), forma un precipitato colorato insolubile che descrive uno spot, ossia una macchia corrispondente ad una singola cellula T antigene specifica. Dopo la comparsa delle macchie, la reazione enzimatica viene bloccata con un lavaggio in acqua; la piastra viene fatta seccare e successivamente analizzata mediante scansione all'ELISPOT Reader (Eli.Expert, A.EL.VIS).

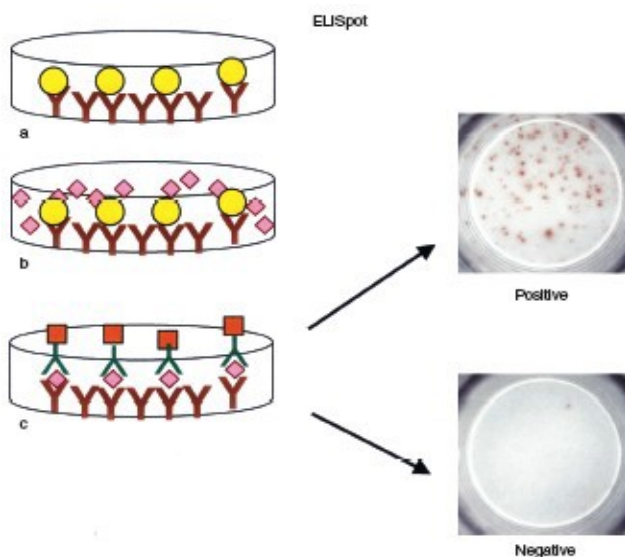


Figura 4 - Test ELISPOT: (a) semina di PBMCs e stimolazione; (b) secrezione della citochina, catturata dall'anticorpo adeso sul fondo; (c) aggiunta di anticorpo secondario coniugato con enzima. Esito positivo e negativo del saggio (Hernandez-Fuentes et al. 2003, 247-264).

Nel progetto si è valutata la frequenza di cellule T CMV-specifiche secernenti IFN- γ . È ampiamente riconosciuto in letteratura (9) che le componenti dell'immunità adattativa responsabili della risposta antivirale contro CMV sono linfociti T CD8⁺ citotossici e CD4⁺ TH1, entrambe popolazioni caratterizzate dalla secrezione di IFN- γ in seguito all'attivazione. Si è perciò utilizzato un kit ELISPOT IFN- γ (AID Diagnostika GmbH), le cui piastre a 96 pozzetti sono rivestite con un anticorpo di cattura per IFN- γ . Le cellule mononucleate del sangue periferico precedentemente estratte sono state risospese in terreno RPMI completo ad una concentrazione di 1×10^6 cellule/ml e quindi seminate in piastra.

3.2.4 Valutazione dell'avidità delle immunoglobuline IgG per CMV

È stato dimostrato che dopo l'infezione primaria di Citomegalovirus si ha una progressiva maturazione dell'avidità delle IgG CMV-specifiche (25). Pertanto il test IgG avidity può essere utilizzato a scopo diagnostico per individuare i pazienti recentemente infettati da CMV dai pazienti con infezione pregressa. La valutazione dell'avidità delle IgG CMV-specifiche è attualmente uno dei test impiegati per la valutazione del rischio di infezione da CMV in gravidanza. Per valutare se questo saggio può essere utilizzato come surrogato o alternativo al test ELISPOT nell'individuare pazienti trapiantati particolarmente a rischio di infezione e malattia da CMV, si è impiegato un dosaggio immunoenzimatico EIA (Enzyme Immunoassay).

Nel progetto si è utilizzato il kit Citomegalovirus IgG Avidity (Radim) per la determinazione dell'avidità delle IgG CMV-specifiche dei pazienti. In questo test, il siero del paziente viene fatto reagire in doppio con un antigene di Citomegalovirus (gB) adeso sul fondo di una piastra a 96 pozzetti e quindi incubato per un'ora a 37% al 5% di CO₂. Assieme ai campioni di siero vengono allestiti un controllo positivo e negativo, rispettivamente ad alta e bassa avidità. Dopo un lavaggio, ai pozzetti vengono aggiunte due differenti soluzioni tampone, una delle quali contiene urea quale agente dissociante. L'urea è infatti responsabile della dissociazione dei legami labili antigene-anticorpo a bassa avidità. Dopo il successivo lavaggio, ai pozzetti viene aggiunto un anticorpo anti-IgG umane coniugato con perossidasi di rafano (HRP, Horseradish Peroxidase), a cui segue, dopo opportuna incubazione e lavaggio, l'aggiunta del substrato cromogeno dell'enzima, tetrametilbenzidina (TMB). La reazione enzimatica viene quindi bloccata mediante l'aggiunta di un reagente bloccante, costituito da una soluzione di acido solforico (H₂SO₄, 1 N). La piastra viene quindi analizzata ad uno spettrofotometro ALISEI (Radim), che misura la densità ottica delle soluzioni alla lunghezza d'onda di 450 nm. Il valore dell'avidità per ogni campione viene calcolato con la seguente formula: (densità ottica con reagente dissociante / densità ottica senza reagente dissociante) x 100 = percentuale di avidità.

3.3 Analisi Statistica

3.3.1 Test di Kruskal-Wallis

Il test di Kruskal-Wallis è un test statistico non parametrico, basato sui ranghi dell'ANOVA a un criterio/via. Il termine ANOVA è un acronimo per Analisi Della Varianza e l'impiego di questo test permette di:

- capire se esiste un legame tra due variabili
- comprendere la natura di una delle due variabili
- stimare entrambe le variabili .

Il test di Kruskal-Wallis, analogamente al test di Mann-Whitney, viene utilizzato quando i dati di un particolare campione non possiedono una distribuzione normale. L'ipotesi nulla di questo test (H_0) è che le distribuzioni del fenomeno considerato, generalmente la mediana, all'interno dei gruppi siano tutte uguali.

Questo test è stato utilizzato in questo studio per individuare se tra i gruppi considerati fossero presenti delle differenze significative per quanto riguardava la risposta immunitaria specifica per CMV analizzata mediante le tecniche dell'ELISPOT e dell'Avidity Test. Al fine di individuare eventuali correlazioni è stato impiegato il test ANOVA tenendo come significativi valori di $p < 0.05$. Inoltre per definire le cinetiche di recupero immunologico nei trapiantati è stato applicato il modello delle splines.

4. RISULTATI

4.1 Caratteristiche della popolazione

La popolazione in esame è costituita da 209 pazienti adulti sottoposti a SOT in follow-up presso i centri trapianti di cuore (47 pazienti), fegato (60 pazienti) e rene (102 pazienti) dell' Ospedale Civile di Padova.

I pazienti sono stati suddivisi in 2 gruppi: 38 pazienti sieronegativi (D+/R-), di cui 29 trapiantati di rene(K), 5 trapiantati di cuore (H), 4 trapiantati di fegato (L) ; 170 pazienti sieropositivi (R+), di cui 73 trapiantati di rene(K), 42 trapiantati di cuore(H), 56 trapiantati di fegato (L).

Ciascuno di questi gruppi sono stati poi suddivisi in 3 sottogruppi a seconda del tipo di SOT:

- trapianto di rene sieronegativo (D+/R- K)
- trapianto di cuore sieronegativo (D+/R- H)
- trapianto di fegato sieronegativo (D+/R- L)
- trapianto di rene sieropositivo (R+ K)
- trapianto di cuore sieropositivo (R+ H)
- trapianto di fegato sieropositivo (R+ L).

All'interno di questa coorte, 41 pazienti assumevano terapia immunosoppressiva con inibitori di mTOR (everolimus e rapamicina), 17 pazienti avevano sviluppato rigetto (trattato in tutti i casi con corticosteroidi tranne in uno che era stato trattato anche con ATG).

	D+/R-	R+
Heart	5	42
Liver	4	56
Kidney	29	73
	38	171

Tabella 1 – caratteristiche della popolazione

4.2 Casi di infezione primaria e di riattivazione

Durante il periodo di studio, come riportato in tabella 2, 18 pazienti sieronegativi hanno sviluppato infezione primaria, di cui 2 sottoposti a trapianto di cuore, 12 a trapianto di rene e 4 a trapianto di fegato; 21 pazienti sieropositivi hanno riattivato il virus, di cui 4 sottoposti a trapianto di cuore, 14 a trapianto di rene e 3 a trapianto di fegato.

In 170 pazienti non vi è stato aumento della viremia.

Type of infection	SOT (H= heart, K= kidney, L= liver)			Total
	H	K	L	
No infection D+/R-	3 (6%)	17 (16%)	0 (0%)	20 (10%)
No infection R+	38 (81%)	59 (58%)	53 (88%)	150 (72%)
Primary infection D+/R-	2 (4%)	12 (12%)	4 (7%)	18 (8%)
Reactivation R+	4 (9%)	14 (14%)	3 (5%)	21 (10%)
Total	47	102	60	209

Tabella 2 – Casi di infezione primaria e riattivazione

Dai dati relativi alla viremia, valutata con metodica PCR Real Time, come mostrato in figura 5, si evince che i pazienti sieronegativi che hanno sviluppato infezione primaria presentavano livelli di viremia di circa 100.000 (10^5 - 10^6)/copie/mL di sangue intero, mentre nei pazienti che riattivavano il virus la CMV-DNAemia risultava nettamente inferiore (8.000 - 10.000 (10^3 - 10^4)/ copie/mL)

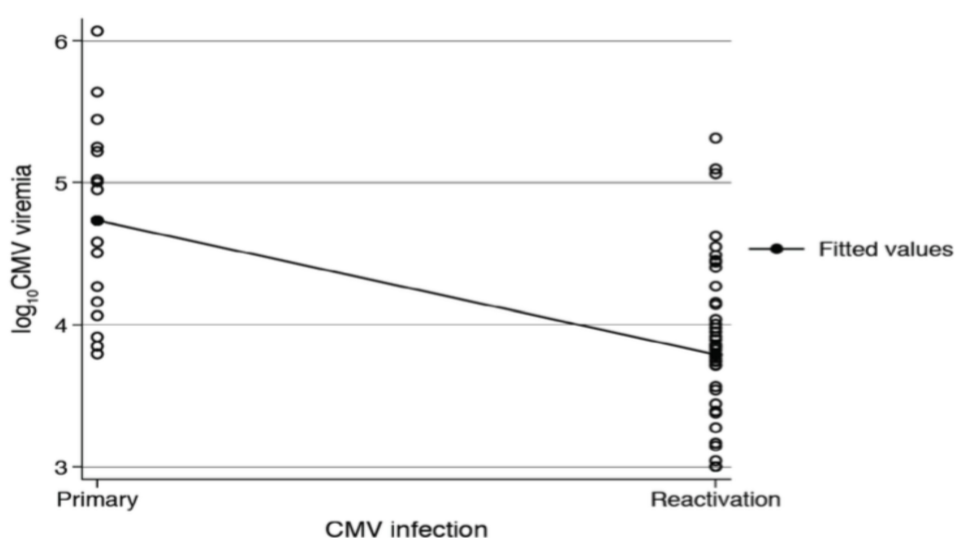


Figura 5 - livelli di CMV-DNAemia nei pazienti con SOT

4.3 Confronto dei dati ELISpot nei vari tipi di SOT

Il test ELISpot ha dimostrato che i pazienti nefrotrapiantati, sia sieropositivi che sieronegativi, a differenza dei pazienti sottoposti a trapianto di cuore e di fegato, hanno minore capacità di sviluppare una immunità cellulo-mediata specifica (figura 6 e tabella 3) e quindi l'immunoricostituzione richiede in essi un tempo più lungo per essere completata.

In particolare i dati a disposizione hanno evidenziato una eterogenea ricostituzione della immunità T cellulare nei pazienti sieropositivi nei primi mesi post-trapianto; mentre nei pazienti sieronegativi, che vengono trattati con terapia profilattica con valganciclovir, abbiamo osservato episodi di viremia tardivi con prevalenza relativamente bassa e correlati a immunoricostituzione tardiva al termine della terapia profilattica (180 giorni).

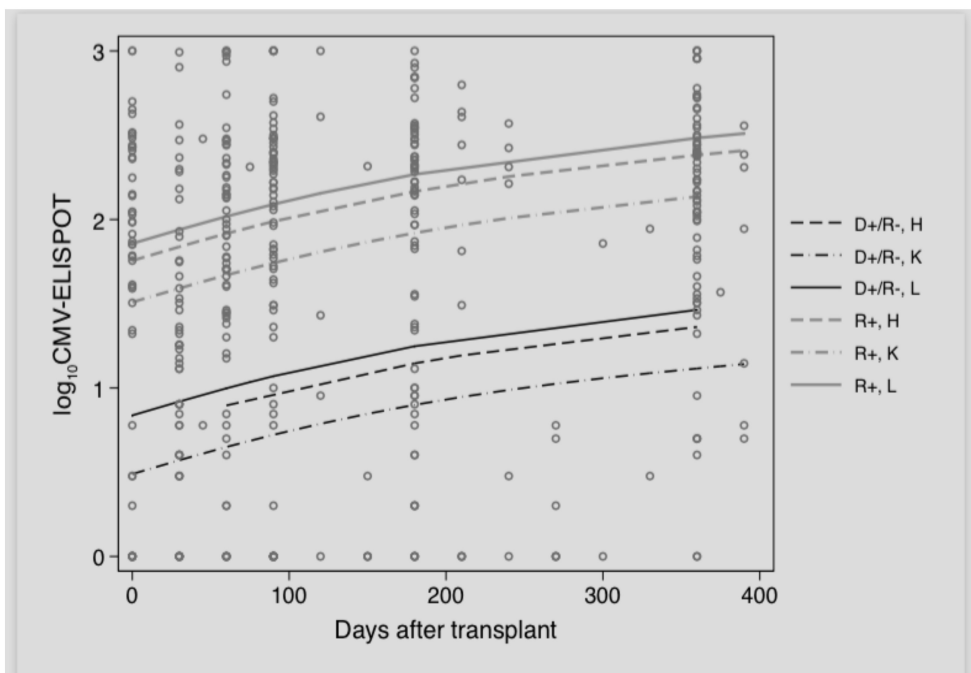


Figura 6 - ELISpot nei pazienti con SOT

Dependent: log ₁₀ (ELISPOT)						
Comparison	Contrast	STr.Err	T	P	95% Conf.Interval	
K vs H	-0.53	0.10	5.07	0.000	- 0.74	-0.33
L vs H	0.04	0.12	0.34	0.737	- 0.20	0.28
L vs K	0.57	0.10	5.57	0.000	0.37	0.77

Tabella 3: - test t-student ELISpot in pazienti con SOT

4.4 CMV-Avidity e CMV-IgG

In ultimo abbiamo eseguito il test di CMV IgG avidity e la quantificazione del titolo anticorpale sui pazienti sieropositivi per valutare l'intervento della risposta umorale nel controllo dell'infezione da CMV. Il titolo anticorpale (IgG) per CMV e l'avidità delle IgG CMV-specifiche sono risultate simili nei 3 gruppi di pazienti, anche nei 21 casi di riattivazione. (figure 7 e 8). tale risultato conferma il ruolo marginale svolto da questo tipo di difesa nell'infezione da CMV.

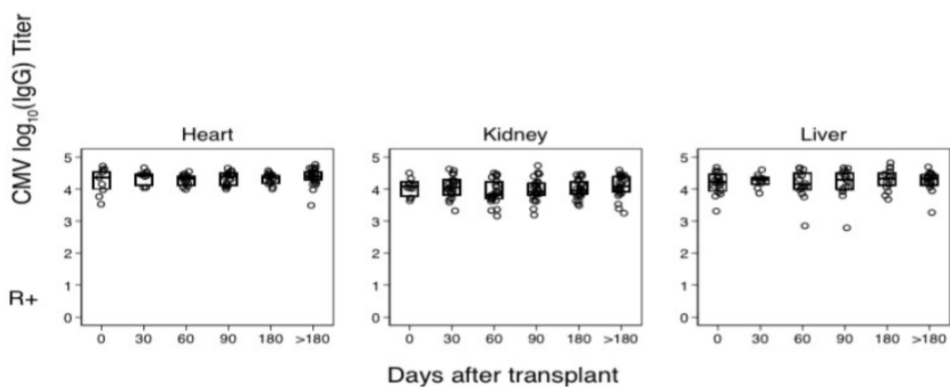


Figura 7 - titolo CMV-IgG nei pazienti con SOT

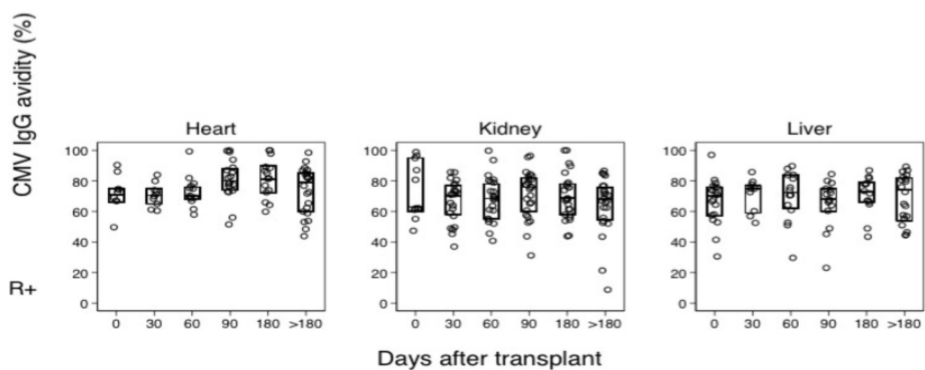


Figura 8 - CMV-avidity nei pazienti con SOT

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le nuove conoscenze sul trapianto d'organo e la disponibilità di potenti farmaci immunosoppressori hanno portato ad un maggior controllo della risposta umorale e cellulare e, conseguentemente, ad una riduzione del danno acuto e cronico da questa determinato.

Nell'ultimo decennio, tuttavia, la ridotta incidenza di rigetto acuto non è stata accompagnata da un corrispondente miglioramento della sopravvivenza del graft. Infatti la modulazione della risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata da parte di questi farmaci immunosoppressori espone il paziente trapiantato ad un maggior rischio di infezioni, soprattutto da patogeni opportunisti, tra cui il più frequente il Cytomegalovirus umano (CMV). Infatti il 50-75% dei paziente sottoposti a SOT nel primo anno post-trapianto va incontro ad una infezione primaria oppure ad una riattivazione virale, se determinata dallo stesso ceppo di CMV dell'infezione originale, o una reinfezione se determinata da un ceppo distinto. (26)

Diversi studi hanno dimostrato il ruolo importante della ricostituzione dell'immunità T cellulare CMV-specifica nei trapianti di organo solido per frenare gli effetti dannosi dell'infezione da CMV.

Uno dei test più validi per misurare l'entità della risposta immune cellulare specifica è l'ELISpot (enzyme-linked immunosorbent spot assay) anti-CMV.

Uno studio eseguito presso il nostro centro trapianti nel 2010 (27) analizzava il recupero della immunità T-specifica nel post-trapianto attraverso test ELISpot, nel primo anno post-trapianto; venivano confrontati due gruppi di pazienti nefrotrapiantati, R+ (trattati con terapia pre-emptiva qualora i valori di CMV-DNAemia fossero > 10000 copie/mL) e R- (trattati con terapia profilattica per i primi 180 giorni dopo il trapianto). Questo studio ha dimostrato che i riceventi sieropositivi (R+) recuperano l'immunità cellulo-mediata 60 giorni dopo il trapianto, mentre i riceventi sieronegativi (R-) sviluppano una immunità cellulo-mediata specifica solo dopo una infezione primaria. Veniva inoltre evidenziato che la terapia con ATG non interferiva significativamente la risposta T-cellulare CMV-specifica.

Partendo da tali presupposti abbiamo eseguito questo studio per confrontare il recupero della immunità T-specifica per CMV nel trapianto di organi solidi, rene, cuore e fegato. Il differente comportamento della ricostituzione immunologica che abbiamo osservato nei vari tipi di SOT è sicuramente condizionato dallo stato sierologico pre-trapianto. Un altro importante fattore è costituito dalla diversa dose di immunosoppressione necessaria ad impedire il rigetto del graft, che nel trapianto di rene è sicuramente maggiore rispetto a quella somministrata nel trapianto di fegato e di cuore. Altre valide motivazioni potrebbero inoltre risiedere negli episodi infettivi concomitanti che possono ridurre l'immunità cellulare nel tempo e nelle diverse caratteristiche immunologiche intrinseche dei vari organi.

I risultati ottenuti da questo studio potrebbero avere in futuro un risvolto interessante sul piano clinico. Il test ELISpot rappresenta infatti un saggio rapido e di semplice esecuzione per la valutazione della immunità CMV-specifica nei pazienti con SOT, che potrebbe affiancare il monitoraggio virologico, ovvero la CMV-DNAemia, per la valutazione del rischio di infezione e malattia da CMV.

Nel nostro studio abbiamo utilizzato come cut-off immunologico un valore di ELISpot pari a 100 SFCs/200.000 PBMC, valore ottimale per livelli di sensibilità e specificità. Tale valore soglia potrebbe acquisire una importanza fondamentale se correlato al rischio di sviluppare malattia da CMV, in quanto potrebbe influenzare le decisioni terapeutiche più della sola evidenza di riattivazione virale. Infatti grazie a questo test sarebbe possibile individuare i pazienti a maggior rischio di infezione da CMV e creare per essi una terapia “su misura” (tailored therapy) in base all'immunità virus-specifica, adeguando la terapia antivirale ed immunosoppressiva e riducendo così i casi di infezioni sintomatiche, anche tardive, e di conseguenza i costi di trattamento; inoltre permetterebbe di ottimizzare l'iter diagnostico terapeutico, riducendo o interrompendo il follow-up virologico nei casi possibili.

Concludendo, dai risultati ottenuti dal nostro studio si evince che:

a. i pazienti nefrotrapiantati, sieronegativi e sieropositivi per CMV, recuperano l'immunità cellulo-mediata specifica più lentamente rispetto ai

pazienti trapiantati di cuore e di fegato;

b. in tutti i riceventi sieronegativi tale recupero avviene più lentamente, in genere al termine della terapia profilattica;

c. l'immunità umorale gioca un ruolo marginale nel controllo dell'infezione da CMV nei pazienti con SOT;

d. l'utilizzo del test ELISpot nella pratica clinica permetterebbe di individuare i casi a rischio e di poter ottimizzare il loro trattamento, evitando così casi di infezione tardiva e conseguenze ad essi correlate.

Bibliografia

- (1) Toledo-Pereyra L. H., and J. M. Palma-Vargas. 1999. Searching for history in transplantation: Early modern attempts at surgical kidney grafting. *Transplantation Proceedings* 31: 2945-8.
- (2) Weber M., S. Deng, K. Olthoff, A. Najj, C. F. Barker, A. Shaked, and K. L. Brayman. 1998. Organ transplantation in the twenty-first century. *The Urologic Clinics of North America* 25: 51-61.
- (3) Linden P. K. 2009. History of solid organ transplantation and organ donation. *Critical Care Clinics* 25: 165-84.
- (4) Fishman J. A., and R. H. Rubin. 1998. Infection in organ-transplant recipients. *The New England Journal of Medicine* 338,24: 1741-51.
- (5) Landolfo S., M. Gariglio, G. Gribaudo, and D. Lembo. 2003. The human cytomegalovirus. *Pharmacology & Therapeutics* 98: 269-97.
- (6) G. Antonelli, M. Clementi, G. Pozzi, G. Rossolini, (2008), *Principi di Microbiologia Medica*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp. B74, B91-94.
- (7) J. Johnson, B. Anderson, R. F. Pass, (2012), *Prevention of Maternal and Congenital Cytomegalovirus Infection*, *Clinical obstetrics and gynecology*, 55, 521-530.
- (8) Emery VC . *Human Cytomegalovirus*. 2007. International Medical Press.
- (9) Addo MM, Rosenberg ES. Cellular immune responses in transplantation-associated chronic viral infections. *Transpl Infect Dis*. 2002 Mar;4(1):31-40.
- (10) La Rosa C, Diamond DJ. The immune response to human CMV. *Future Virol*. 2012 Mar 1;7(3):279-93.

- (11) J. Hassan and J. Connell. Translational Mini-Review Series on Infectious Disease: Congenital cytomegalovirus infection: 50 years on. *Clin Exp Immunol* 2007; 149.
- (12) Brigitte Godard, Agnès Gazagne, Alain Gey, Muriel Baptiste, Benoit Vingert, Beatrice Pegaz-Fiornet, Laurence Strompf, Wolf H. Fridman, Denis Glotz, and Eric Tartour. Optimization of an Elispot Assay to Detect Cytomegalovirus– Specific CD8_ T Lymphocytes. *Human Immunology* 65, 1307–1318 (2004).
- (13) Tolkoff-Rubin, N. E., J. A. Fishman, and R. H. Rubin. 2001. The bidirectional relationship between cytomegalovirus and allograft injury. *Transplantation Proceedings* 33: 1773-5.
- (14) Fishman, J. A., V. Emery, R. Freeman, M. Pascual, L. Rostaing, H. J. Schlitt, D. Sgarabotto, J. Torre-Cisneros, and M. E. Uknis. 2007. Cytomegalovirus in transplantation – challenging the status quo. *Clinical Transplantation* 21: 149-158.
- (15) Legendre, C., and M. Pascual. 2008. Improving outcomes for solid-organ transplant recipients at risk from cytomegalovirus infection: Late-onset disease and indirect consequences. *Clinical Infectious Diseases* 46: 732- 40.
- (16) Eid, A. J., S. K. Arthurs, P. J. Deziel, M. P. Wilhelm, and R. R. Razonable. 2008. Emergence of drug-resistant cytomegalovirus in the era of valganciclovir prophylaxis: Therapeutic implications and outcomes. *Clinical Transplantation* 22: 162-70.
- (17) Husain, S., C. E. Pietrangeli, and A. Zeevi. 2009. Delayed onset CMV disease in solid organ transplant recipients. *Transplant Immunology* 21: 1-9.
- (18) Vichot AA, Formica RN Jr, Moeckel GW. Cytomegalovirus glomerulopathy and cytomegalovirus interstitial nephritis on sequential

transplant kidney biopsies. *Am J Kidney Dis.* 2014 Mar 63(3):536-9.

(19) Razonable RR. Cytomegalovirus infection after liver transplantation: current concepts and challenges. *World J Gastroenterol* 2008 Aug 21; 14(31):4849-4860.

(20) Keenan RJ, Lega ME et al. Cytomegalovirus serologic status and postoperative infection correlated with risk of developing chronic rejection after pulmonary transplantation. *Transplantation* 1991 Feb; 51(2):433-438.

(21) Grattan MT, Moreno-Cabral CE, Shumway NE. Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis. *JAMA* 1989 Jun 23-30; 261(24):3561-3566.

(22) Griffiths, P. D., R. Whitley, D. R. Snyderman, N. Singh, and M. Boeckh. 2008. Contemporary management of cytomegalovirus infection in transplant recipients: Guidelines from an IHMF workshop, 2007. *Herpes: The Journal of the IHMF* 15,1: 4-12.

(23) Kusne S, R Shapiro, and J Fung. Prevention and treatment of cytomegalovirus infection in organ transplant recipients. *Transplant Infectious Disease* 1999;1:187-203.

(24) Mengoli, C., R. Cusinato, M. A. Biasolo, S. Cesaro, C. Parolin, and G. Palù. 2004. Assessment of CMV load in solid organ transplant recipients by pp65 antigenemia and real-time quantitative DNA PCR assay: Correlation with pp67 RNA detection. *Journal of Medical Virology* 74: 78- 84.

(25) Andrews, J. I. 2004. Diagnosis of fetal infections. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology* 16: 163-6.

(26) Rubin RH: Infection in the organ transplant recipient. In Rubin RH, Young LS: *Clinical Approach to Infection in the Compromised Host*, 3rd ed. New York, Plenum Press, 1994, pp629-705.

(27) Abate D, Saldan A, Fison M, Cofano S, Paciolla A, Furian L, Ekser B, Biasolo MA, Cusinato R, Mengoli C, Bonfante L, Rossi B, Rigotti P,

Sgarabotto D, Barzon L, Palù G. Evaluation of cytomegalovirus (CMV)-specific T cell immune reconstitution revealed that baseline antiviral immunity, prophylaxis, or preemptive therapy but not antithymocyte globulin treatment contribute to CMV-specific T cell reconstitution in kidney transplant recipients. *J Infect Dis.* 2010 Aug 15;202(4):585-94.