

Le tecniche molecolari nel monitoraggio del paziente trapiantato



- Rigetto ed infezione sono le principali cause di insuccesso del trapianto e sono due processi intimamente associati e interdipendenti
- Le terapie immunosoppressive creano una condizione favorente l'insorgenza dei processi infettivi
- Oltre 2/3 dei trapiantati va incontro ad almeno un episodio infettivo nel primo anno dal trapianto, con una letalità tra il 15 ed il 45%. Incidenza correlata all'età.

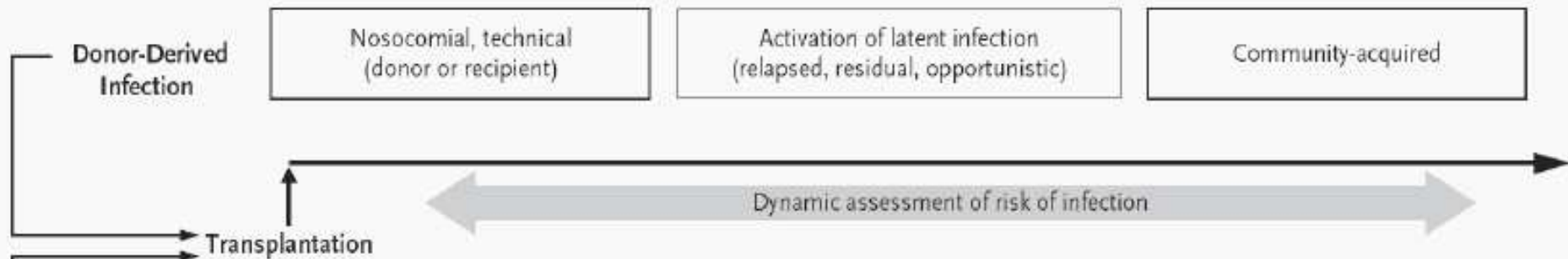
- Infezioni trasmesse dal donatore
- Infezioni preesistenti nel ricevente
- Infezioni nosocomiali
- Infezioni contratte in comunità

Il trapiantato nei primi mesi



Il trapiantato dopo i primi tre mesi



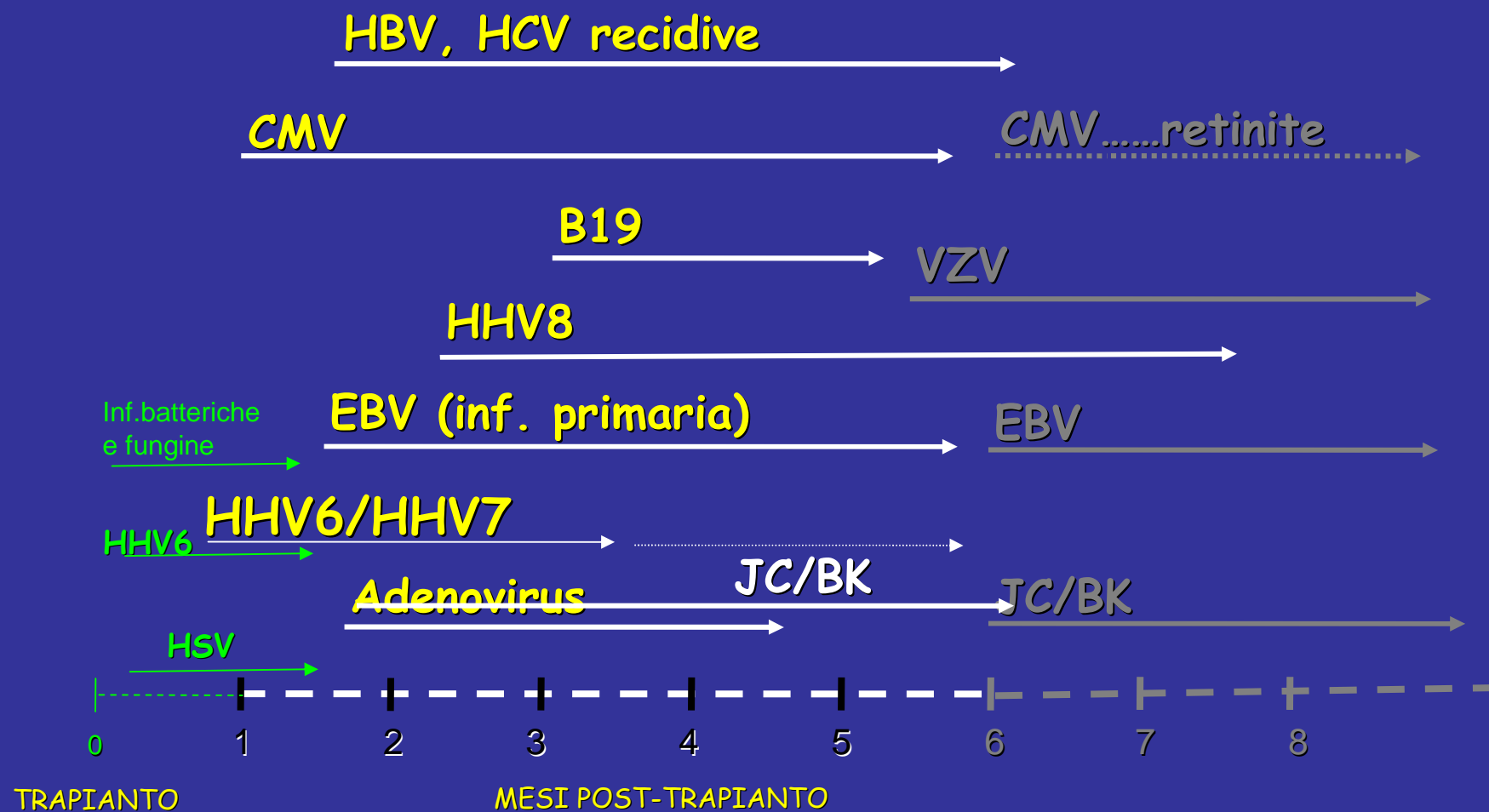


Common Infections in Solid-Organ Transplant Recipients

	<1 Month	1–6 Months	>6 Months
Donor-Derived Infection	<ul style="list-style-type: none"> Infection with antimicrobial-resistant species: <ul style="list-style-type: none"> MRSA VRE Candida species (non-albicans) Aspiration Catheter infection Wound infection Anastomotic leaks and ischemia <i>Clostridium difficile</i> colitis 	<ul style="list-style-type: none"> With PCP and antiviral (CMV, HBV) prophylaxis: <ul style="list-style-type: none"> Polyomavirus BK infection, nephropathy <i>C. difficile</i> colitis HCV infection Adenovirus infection, influenza <i>Cryptococcus neoformans</i> infection <i>Mycobacterium tuberculosis</i> infection Anastomotic complications 	<ul style="list-style-type: none"> Community-acquired pneumonia, urinary tract infection Infection with aspergillus, atypical molds, mucor species Infection with nocardia, rhodococcus species
Recipient-Derived Infection	<ul style="list-style-type: none"> Donor-derived infection (uncommon): <ul style="list-style-type: none"> HSV, LCMV, rhabdovirus (rabies), West Nile virus, HIV, <i>Trypanosoma cruzi</i> Recipient-derived infection (colonization): <ul style="list-style-type: none"> Aspergillus, pseudomonas 	<ul style="list-style-type: none"> Without prophylaxis: <ul style="list-style-type: none"> Pneumocystis Infection with herpesviruses (HSV, VZV, CMV, EBV) HBV infection Infection with listeria, nocardia, toxoplasma, strongyloides, leishmania, <i>T. cruzi</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Late viral infections: <ul style="list-style-type: none"> CMV infection (colitis and retinitis) Hepatitis (HBV, HCV) HSV encephalitis Community-acquired (SARS, West Nile virus infection) JC polyomavirus infection (PML) Skin cancer, lymphoma (PTLD)

NEJM 2007

Tempi di comparsa delle principali infezioni nei soggetti trapiantati

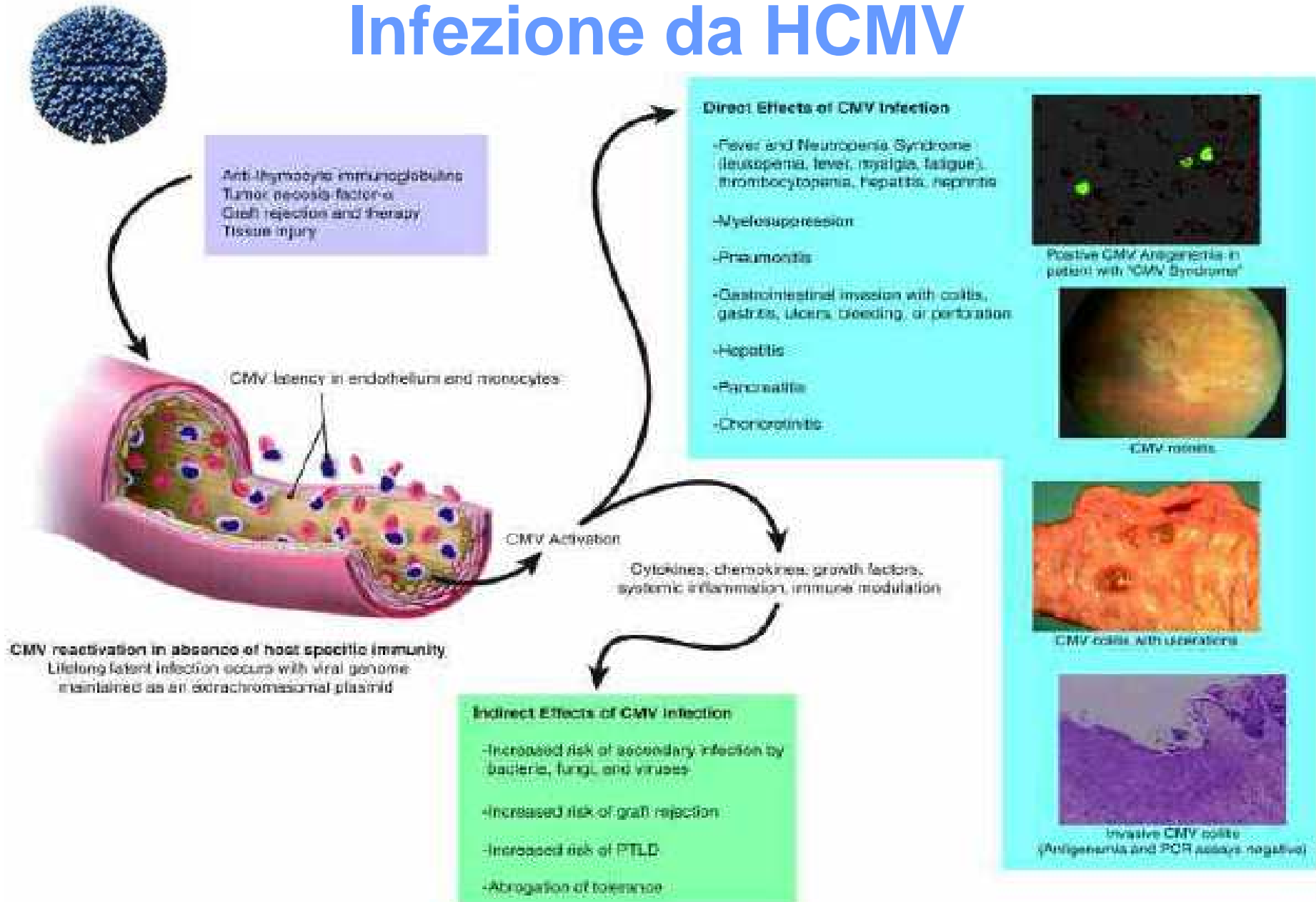


Adattata da Snyderman DR, *Transpl Infect Dis* 1999 and *CID* 2001

American Society of Transplantation recommendations for monitoring of infectious complications in immunosuppression trials in organ transplantation (2006).

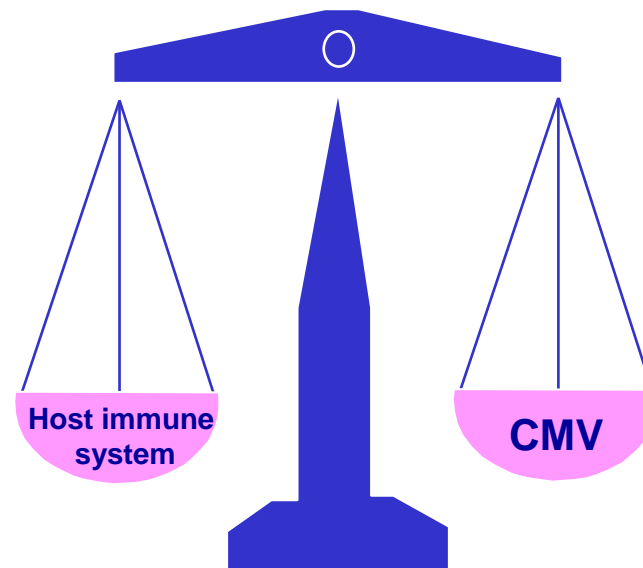
Microrganismo	Monitoraggio raccomandato	Test raccomandato	Commento
CMV	SÌ – minimo controlli mensili	Antigenemia pp65 Real Time PCR sangue e biopsie/BAL	strettamente correlato al regime di profilassi
EBV	SÌ in alcuni gruppi di popolazione ad alto rischio	Real Time PCR	Tutti i R neg pediatrici/adulti
Altri Herpes Virus	NO	-	-
BK Virus	SÌ – TX di rene mensile x 6 mesi, poi a 9 e 12 mesi post tx	Real Time PCR sangue e/o urine	Non necessario nei non TX di rene
HCV	SÌ – TX HCV pos TX fegato/Don HCV+	Real Time PCR sangue e biopsie epatiche	-
Infezioni da funghi	NO	-	-
Infezioni da batteri	NO	-	-

Infezione da HCMV



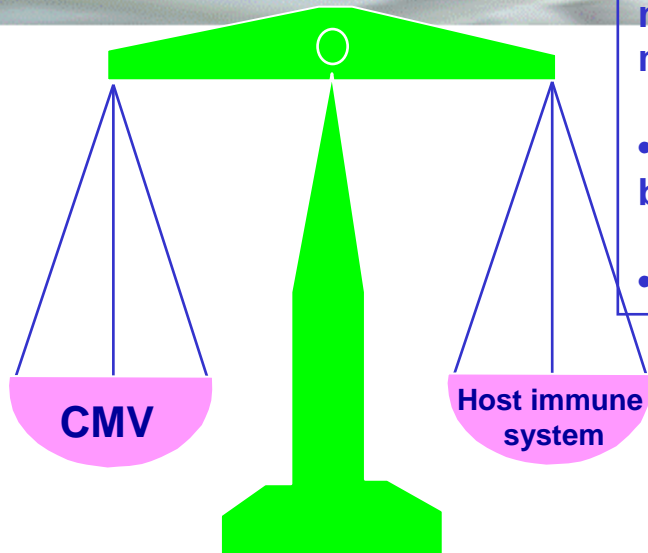
La patogenicità di CMV è in buona parte dovuta alla capacità di interagire con le difese immunologiche dell'ospite.

CMV raggiunge questo equilibrio utilizzando una serie di strategie per evadere le difese immunitarie dell'ospite. In questo modo CMV è capace di persistere a lungo nell'ospite sano, essere trasmesso quindi ad altri individui senza raggiungere elevati livelli di replicazione perché questi potrebbero essere causa di malattia.



Interazione bilaterale

- non-specific humoral immunity: the complement system
- non-specific cellular immunity: neutrophils, eosinophils, monocytes and natural killer (NK)
- specific humoral immunity (immunoglobulins, secreted by B lymphocytes)
- specific cellular immunity (T lymphocytes)

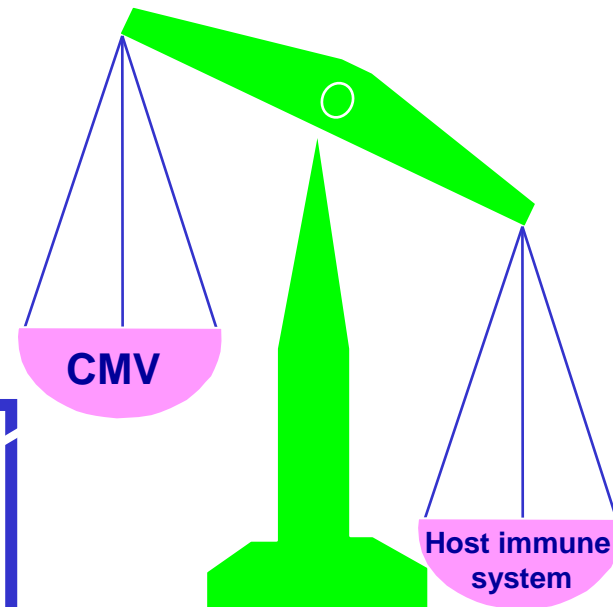


Bilateral interaction

Interference with host immunocompetence

- ⇒ due to immunosuppressive therapy
- ⇒ infection with HIV
- ⇒ pregnancy

**CMV
disease**



Rischio di infezione da CMV: 44 – 85%

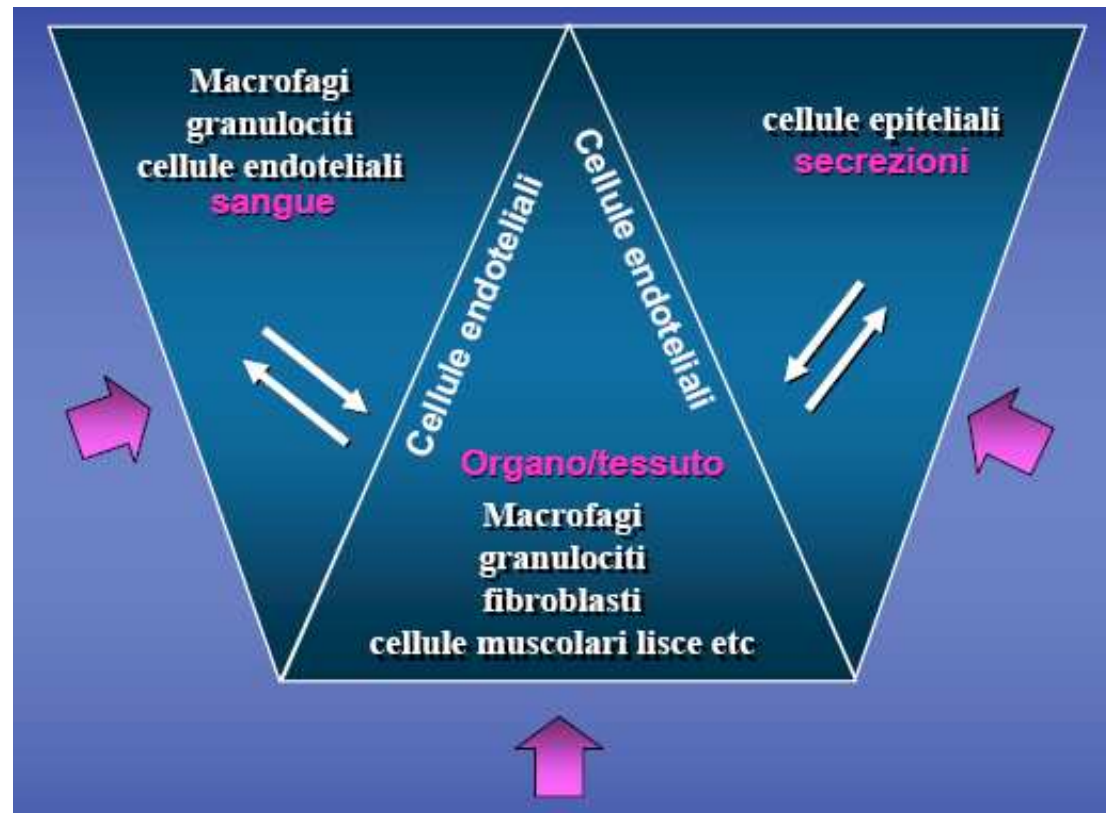
In assenza di strategie di profilassi o di terapia pre-emptive

Trapianto	Rischio di malattia (%)	Rischio di Polmonite (%)
Rene	8-32	2
Fegato	22-29	3
Cuore	9-35	8
Pancreas e/o rene	50	nd
Pancreas e/o rene	50	nd
Cuore e polmone	53-75	30-60
Polmone	60-75	55-60 (R-/D+ 85)
HSCT (70-80%) - TMO	20-35	15



Fattori condizionanti l'infezione da CMV

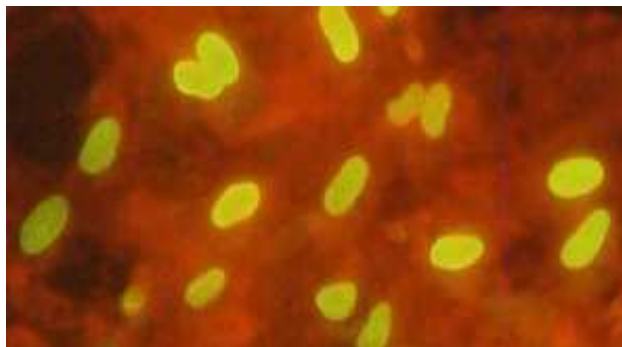
- Stato sierologico ricevente/donatore (R-/D+ R+/D+ R+/D-)
- Deficit della risposta immune specifica per i linfociti citotossici T
- Severa malattia associata al graft-versus-host (GVHD)



CMV è un virus viremico: la fase ematica dell'infezione prelude o è contemporanea alla diffusione generalizzata del virus

MONITORAGGIO DELL'INFEZIONE DA CMV NEI PAZIENTI TRAPIANTATI

Quale è il test più appropriato?



Antigenemia



DNAemia

DNAemia

- **Tempo di esecuzione entro 48-72 h dal prelievo**
- **Quantità di campione 0,2 – 1 mL di sangue**
- **Lo standard di riferimento è stato definito solo recentemente e non ancora in uso**
- **Disponibilità di CQI e VEQ**
- **Attrezzature e formazione adeguate**
- **MOLTO COSTOSO**

Antigenemia Pp65

- **Tempo di esecuzione entro 6 - 8 h dal prelievo**
- **Quantità di campione 3 – 5 mL di sangue**
- **Non esiste uno standard di riferimento**
- **Soggettività di lettura ed interpretazione**
- **Esecuzione molto indaginosa e manuale**
- **MOLTO ECONOMICO**

DNAemia

Segue con maggiore efficienza la cinetica di replicazione del virus, quindi informazioni più utili per l'intervento terapeutico:

- **riduzione dei tempi di trattamento terapeutico antivirale;**
- **riduzione del numero di trattamenti antivirali in uno stesso paziente;**
- **riduzione dei soggetti asintomatici trattati con terapia pre-emptive**

Antigenemia

Non correla efficientemente con la cinetica di replicazione del virus, in particolari casi può dare indicazioni fuorvianti

Lao, Lee et al. 1997;

Humar, Gregson et al. 1999;

Emery, Sabin et al. 2000;

Caliendo, St George et al. 2002;

Humar, Kumar et al. 2002;

Rollag, Sagedalet et al. 2002;

Razonable, van Crujnsenet al. 2003

Villa, Lageet et al. 2003;

Gerna, Sarasini et al. 2003

Rayes, Seehofer et al. 2005;

Schroeder, Michelonet al. 2005

Antivir Ther. 2007;12(1):63-72.

Evaluation of cytomegalovirus DNAemia versus pp65-antigenaemia cutoff for guiding preemptive therapy in transplant recipients: a randomized study.

Gerna et al.

METHODS: A randomized, prospective open-label study,

99 patients were enrolled in the DNAemia arm

101 patients in the antigenemia arm.

Cut off to start therapy: 300,000 DNA copies/ml blood – 100 pp65-positive leukocytes

ARM	Incidence of infection	Incidence of number patients requiring antiviral treatment
99 DNAemia	81/99 81.8%	23/99 23%
101 antigenemia	87/99 86.1%	42/101 41%
	P = ns	P = 0.01

Valori significativi per terapia pre-emptive

Trapianto di organo solido

Gruppo AMCLI-SIV 2005-2008

CMV sieronegativi	≥ 100.000 copie/mL
CMV sieropositivi	≥ 100.000 copie/mL
Boli di steroidi o ATG/OKT3 terapie antirigetto	Qualsiasi valore di DNAemia

Trapianto di cellule staminali emopoietiche / midollo

CMV sieronegativi	≥ 10.000 copie/mL ????
CMV sieropositivi	≥ 10.000 copie/mL ????

- La terapia antivirale viene somministrata fino a DNAemia negativa e/o al di sotto della soglia di sensibilità del test in uso.
- Episodi ricorrenti di infezione attiva sono trattati con interventi farmacologici addizionali considerando sempre come valore soglia di DNAemia ≥ 100.000 copie/mL

Quali campioni ?



- Plasma e sangue intero assicurano ambedue corrette informazioni diagnostiche e prognostiche riguardo la prevenzione della malattia da CMV
- La diagnosi molecolare di infezione da CMV è più sensibile se eseguita su sangue intero

Razonable et al. Transplantation 2002,73: 968-73

Garrigue et al. J Clin Virol 2006, 14: 72-5

Gerna et al. Antivir Ther 2007,12: 63-72



NEL MONITORAGGIO DI UN PAZIENTE UTILIZZARE UN SOLO TIPO DI CAMPIONE

L'organo trapiantato è il principale target per l'infezione e la malattia da HCMV

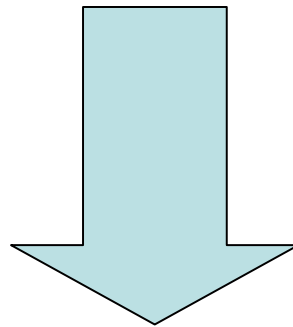
POST TRAPIANTO - trapiantato di polmone R+/D+

data prelievo	sangue	sangue	BAL	BAL	terapia
TX 3.6.2005	Antigenemia N. Cell. pp65 pos/ 2x10 ⁵ PMNL	n. GE/ 1x10 ⁵ PMNL	isolamento	n. GE/ml	
09.06.05	neg	100			profilassi
20.06.05	neg	<100		<100	
30.08.05	neg	<100			STOP
19.09.05	neg	130			
26.09.05	neg	370			
03.10.05	neg	380	pos	5x10 ⁶	GCV/ev
11.10.05	2	10.600	pos	2.5x10 ⁶	
18.10.05	neg	<100			
24.10.05	neg	<100	neg	<100	

Trapianto di intestino

Days post -TX	blood	intestinal biopsy	blood	therapy
R+/D+	Antigenemia N°. pp65 pos cells /2x10 ⁵ PMNLs	n. copies/ μ g DNA	n. copies/ml	
192	0	<10	<500	
210	0	2.700.000	1.120	yes
217	3	1.220.000	10.150	yes
224	13	210.000	9.620	yes
231	0	19.000	2.450	yes
239	0	127	<500	yes
257	0	33	<500	yes
271	0	33	<500	
301	0	<10	<500	
333	0	20	<500	

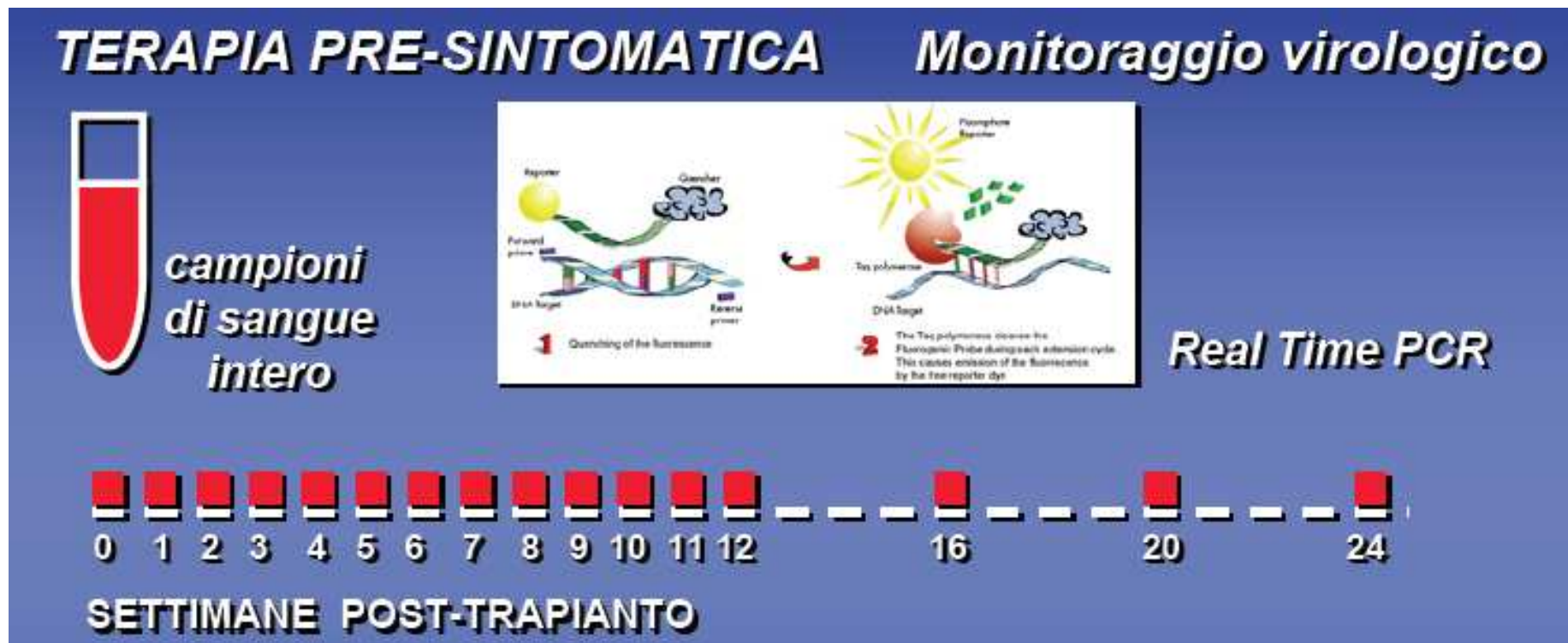
In caso di sospetta localizzazione
d'organo DNAemia presente o
assente o carichi virali molto bassi



PCR real-time



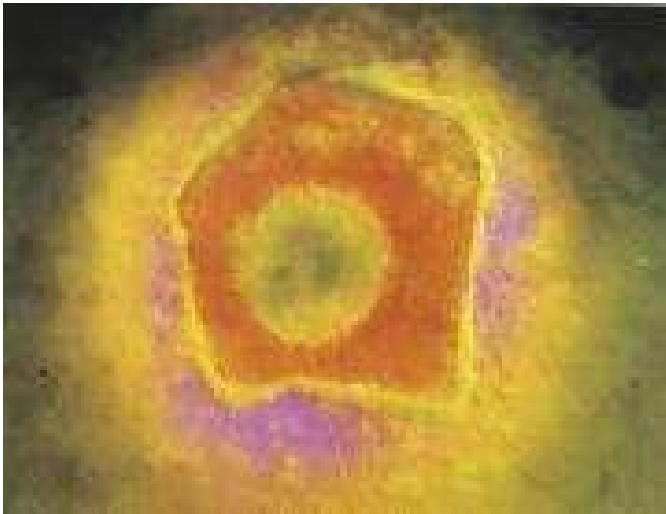
Quando effettuare il monitoraggio



- In corso di infezione in atto → aumentare la frequenza a 2 volte la settimana.
- Oltre i 6 mesi → in concomitanza alle visite di routine
- In caso di aumento di terapia immunosoppressiva → riprendere il monitoraggio.
- Sulla base di una qualsiasi indicazione clinica → riprendere il monitoraggio.

Infezione da EBV

EBV-PTLD



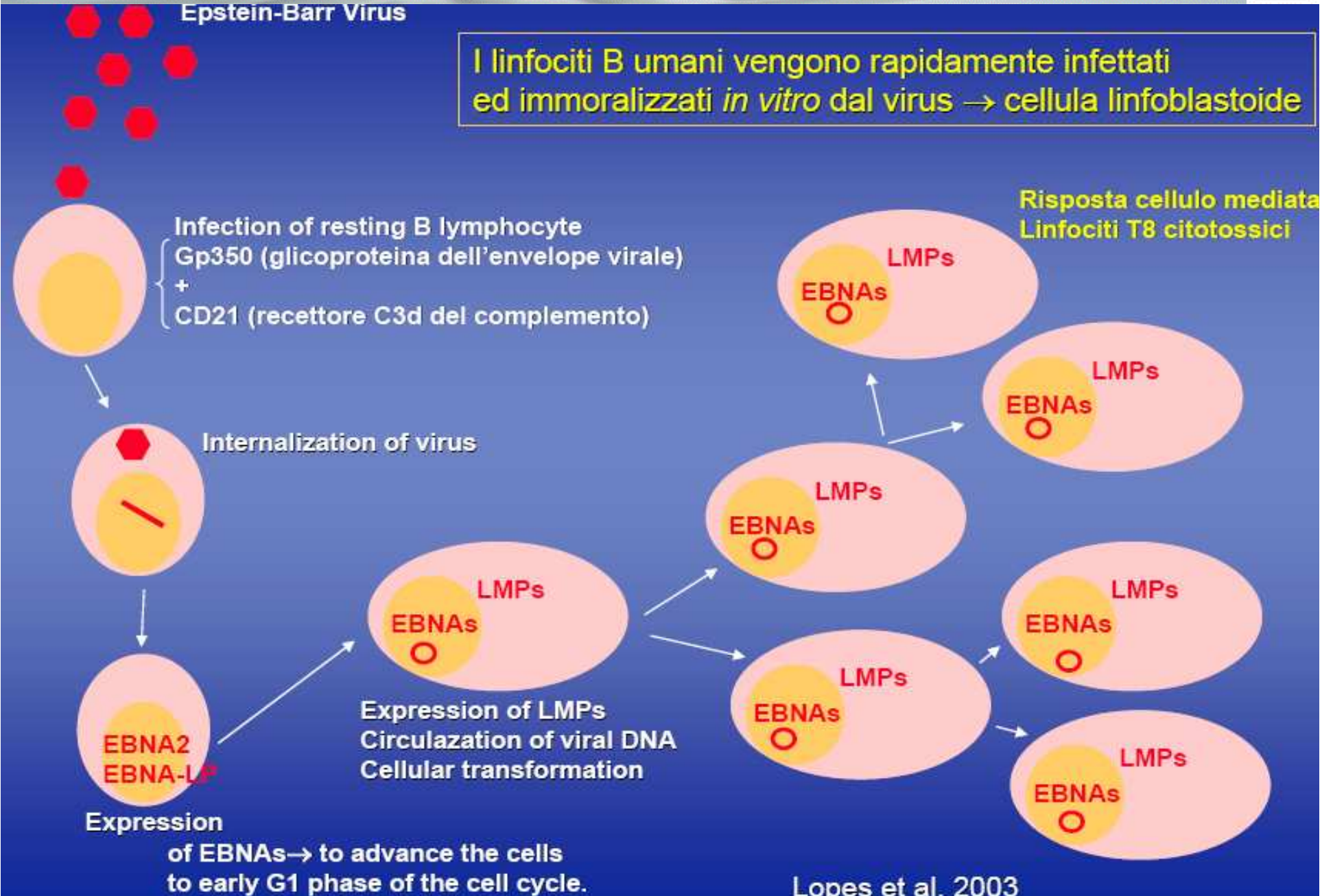
- una delle maggiori complicazioni di natura infettiva post trapianto (in circa l'1-20% di tutti i pazienti trapiantati)
- A seguito di infezione primaria rischio di PTLD aumenta di 70 volte
- La mortalità per le forme monoclonali è pari circa al 60- 80% mortalità

EBV-PTLD

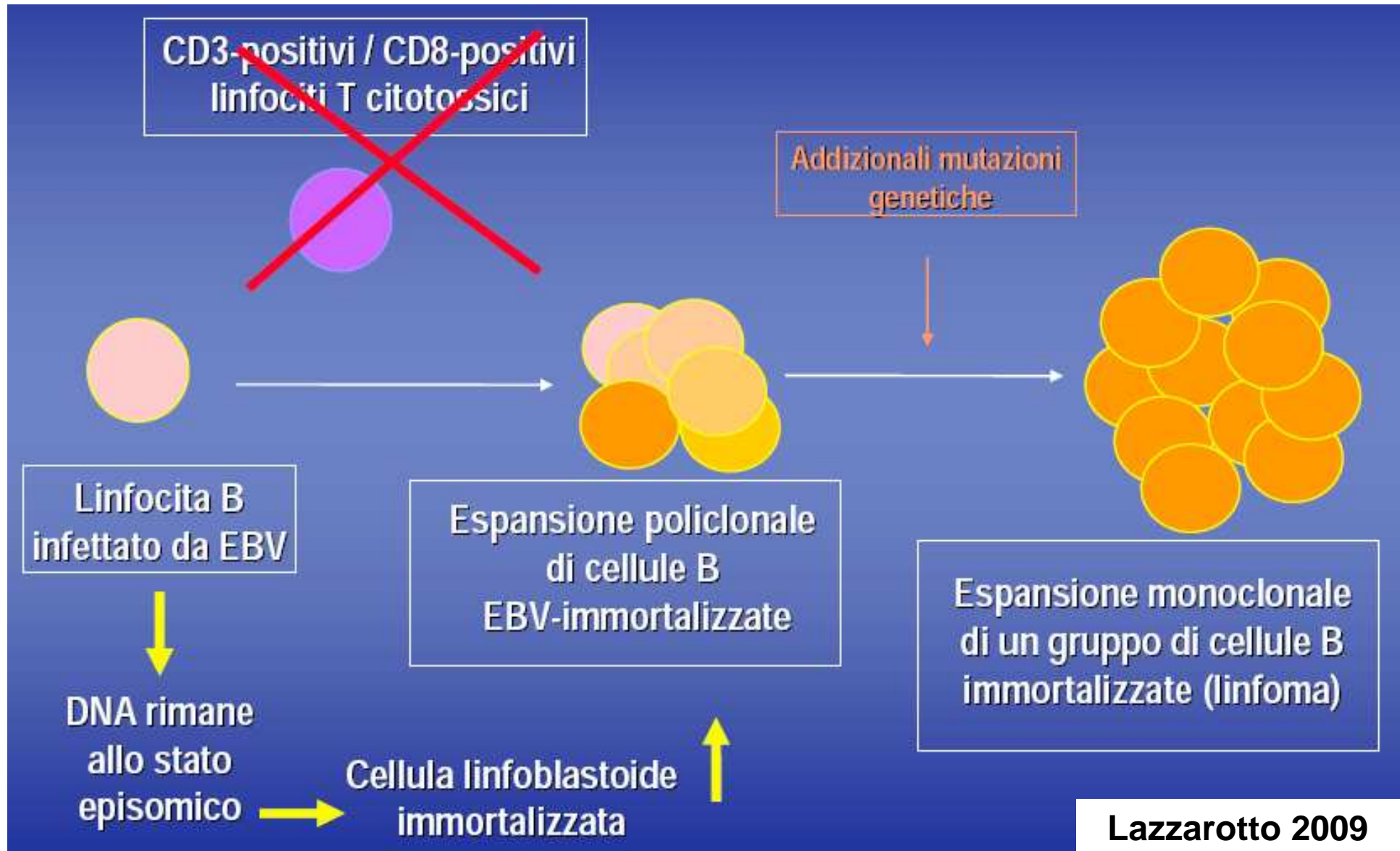
	Incidenza %
Trapianto di rene	1 - 5
Trapianto di fegato	1 - 2
Trapianto cuore-polmone	4.6 - 9.4
Trapianto di intestino	11 - 15
Trapianto di midollo osseo	0 - 4.5
	0 - 0.7
	6.1 - 18.3
	13 - 24

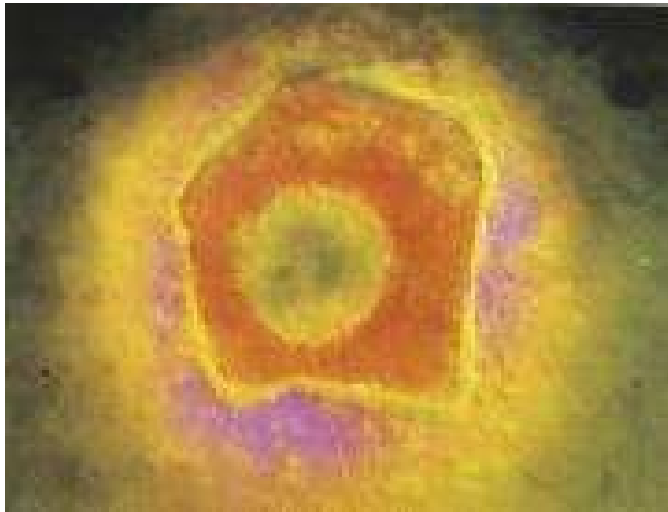
Epstein-Barr Virus

I linfociti B umani vengono rapidamente infettati ed immortalizzati *in vitro* dal virus → cellula linfoblastoide



nel trapiantato

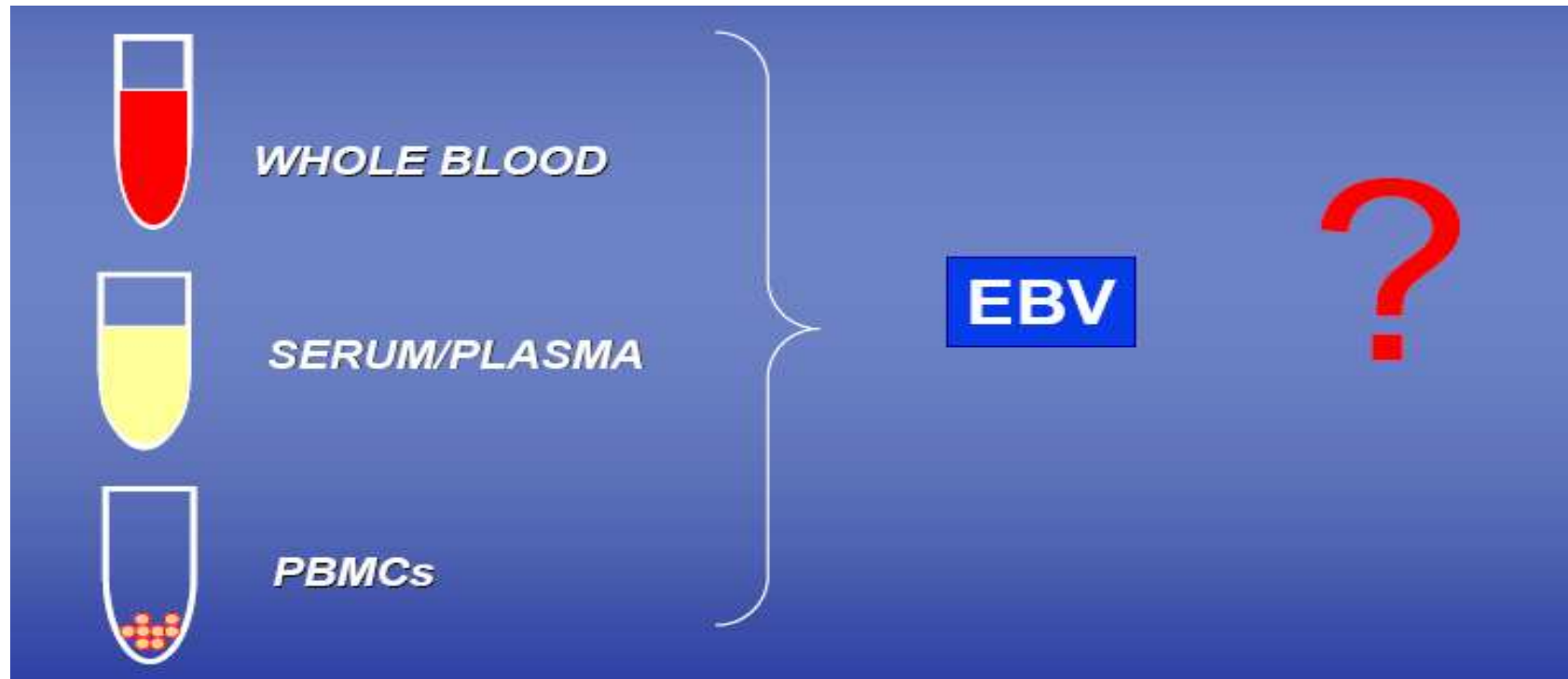




EBV

- **Virus viremico**
- **test di elezione PCR real-time**

Quali campioni ?



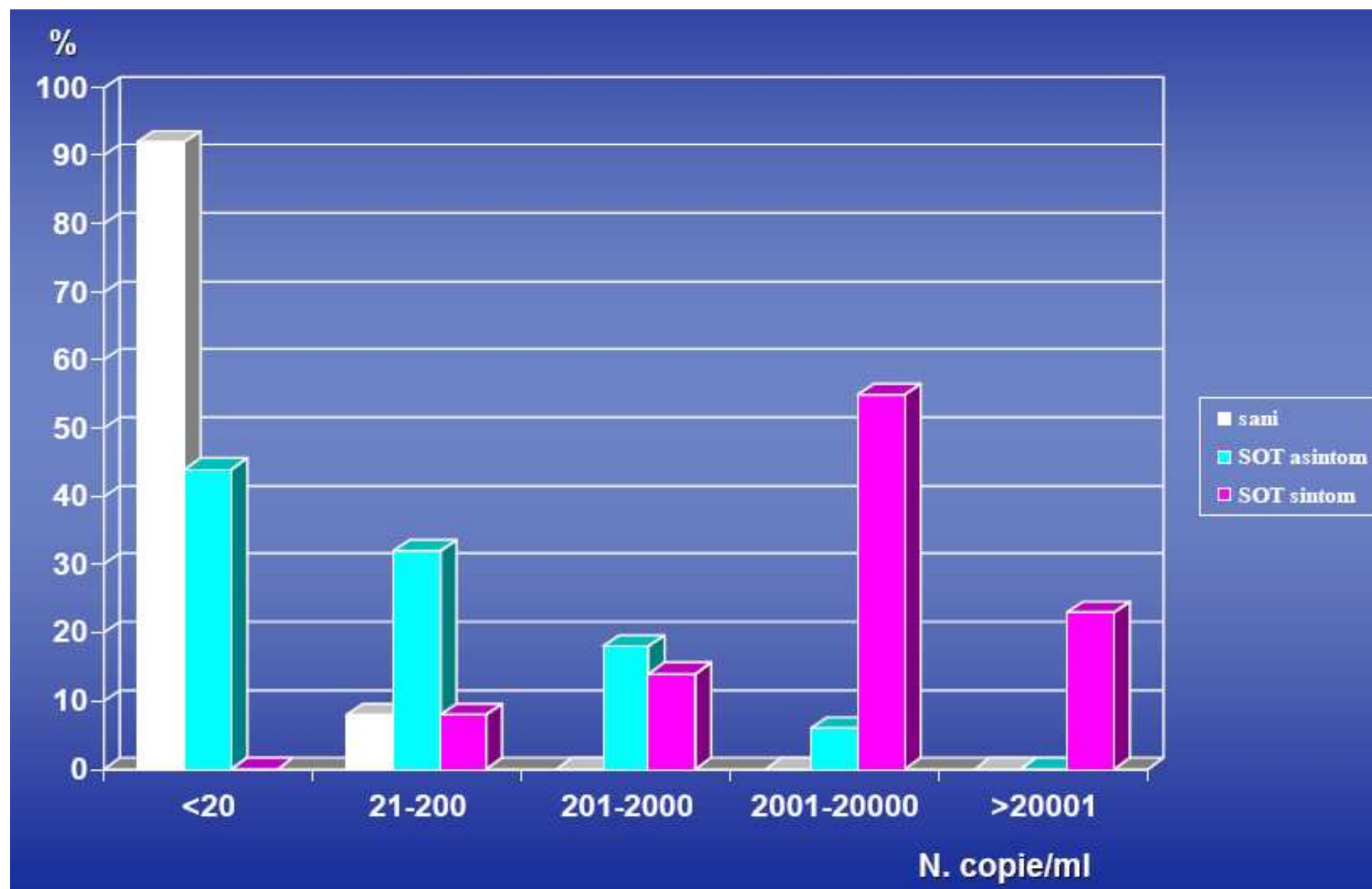
NEL MONITORAGGIO DI UN PAZIENTE UTILIZZARE UN SOLO TIPO DI CAMPIONE

Valori significativi

Il carico virale nel sangue non è sempre un fattore sempre di rischio per l'insorgenza di PTLD

- **45 Trapianti pediatrici di fegato con infezione primaria da EBV solo 7 hanno sviluppato una PTLD (15%).**
Smets et al., Transplantation 2002
- **Il carico virale un buon indicatore di malattia, ma solo una minoranza di PCR positive e alti carichi virali sviluppano una malattia EBV relata . Nei trapianti allogenici di cellule staminali solo pochi pazienti con elevati carichi di EBV nel sangue sviluppano una EBV-PTLD.**
Gartner J, Clin Microbiol 2002
- **Nei trapianti di organo solido alcuni pazienti che presentavano valori di carico virale non molto elevati (da 1.000 a 5.000 copie/ml wb) hanno presentato una PTLD EBV relata**
Baldanti et al., J Clin Microbiol 2000

Probabilità PTLD in rapporto a EBV-DNAemia





Infezioni da HHV6 – HHV7 – HHV8 - VZV

- **HHV6 e HHV7:** comuni nei bambini, ruolo nei trapiantati non completamente definito. Replicazione di HHV6 strettamente associata a immunodepressione, 100% pz.naive con infezione post-trapianto con perdita dell'organo. HHV7 con HCMV sembra fungano da cofattori nella progressione dell'infezione da HCMV nell'immunodepresso
- **HHV8:** Associato a KS e mal. di Castleman, comune la sieroconversione subito dopo il trapianto. KS insorge molto precocemente a seguito del trapianto
- **VZV:** Generalmente da riattivazione. Tendenza a disseminare in ca. 1/3 dei trapiantati affetti con encefalite e polmonite

POLYOMAVIRUS - BK VIRUS

Virus con DNA circolare a doppio filamento (5300 basi) con diametro di 50 nm.
scoperto nel 1971

BK VIRUS codifica 6 proteine virali:

2 proteine “precoci” non strutturali o enzimatiche

- antigene “T antigen”
- antigene “t antigen”

“T antigen” è responsabile dell'immortalità cellulare e della sua latenza

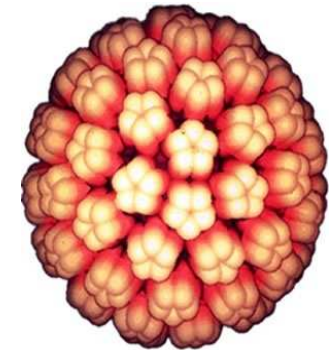
1 agnoproteina (VPx) la diffusione del BKV è controllata dalla fosforilazione
dell'agnoproteina (serina 11)

3 proteine “tardive” (sintetizzate dai “late genes”)

VP1
VP2
VP3



Proteine del capsid



BKV EPIDEMIOLOGIA

- 4 gruppi sierologici e genotipi (differente virulenza)
- presenza ubiquitaria
- 60 / 80% della popolazione (positività anticorpi anti BKV)
- infezione primaria nei bambini (3/4 anni d'età)
- via orale, esposizione vie respiratorie
- innocuo
 - Rimane LATENTE:
 - epitelio renale - epitelio di transizione
 - epitelio tubuli renali
 - epitelio parietale capsula di Bowman
 - cellule linfoidi

L'attiva replicazione del BKV nel tratto urinario è correlata con uno stato di immunosoppressione

ECCESSIVA IMMUNOSOPPRESSIONE



RIDUZIONE ATTIVITA' DEI LINFOCITI T

(misurazione produzione di ATP dopo stimolazione)



PERDITA CONTROLLO INFEZIONI VIRALI

- riattivazione BK virus

REPLICAZIONE VIRALE BKV

TRAPIANTO DI RENE → TERAPIA IMMUNOSOPPRESSIVA



PAZIENTE IMMUNODEPRESSO

I FASE - riattivazione virus dal sito di latenza

VIRURIA

II FASE - diffusione sistemica del virus

VIREMIA

PATOLOGIA DA BKV

PVAN → Polyoma Virus Associated Nephropathy

PAZIENTI IMMUNODEPRESSI → PATOLOGIA

- **Trapianto di rene:** - **nefrite tubulointerstiziale**
(distruzione e infezione delle cellule dei tubuli in fase di replicazione virale)
 - **stenosi ureterale**
- **Trapianto di midollo osseo:** cistiti emorragiche
 - Vasculopatia
 - Meningoencefalopatia
 - Retinite, polmonite, epatite
- LES
- **Sindrome di Guillan Barrè**

PREVALENZA nei pazienti trapiantati

entro il PRIMO anno dal trapianto

Riattivazione virale (VIRURIA) 10 – 30 %

Infezione virale (VIREMIA) 10 %

PVAN 5 % (1- 10%) tra il 15 - 50% perdita
funzione renale

Tra il secondo e quinto anno infezione da BK e diagnosi di BKVN 15- 80 %

2006

2008

Hirsch et al. Transplant. 2005
Ginevri et al. Gior.Ital. Nefr.

Prosser et al. Transplantation

FATTORI DI RISCHIO

- Livello immunosoppressione (farmaco specifico / combinazione farmaci)
- Età avanzata
- Sesso maschile
- Diabete mellito
- Etnia bianca
- Alto titolo anticorpale per BKV nel donatore
- Sieronegatività nel ricevente (Smith et al. Am.J. Transplant 2004)
- Assenza di HLA-C7 nel donatore e ricevente (Bohl et al. Am.J.Transplant 2005)

Nei pazienti con trapianto diverso dal rene la nefropatia da BK raramente compare nei reni nativi (Limaye et al. Am J Transplant 2005).

Il BK è latente nel tratto urogenitale ed è probabile che venga trasportato con il trapianto (Moryama et al T Curr.Prot.Cell. Biol 2009)

MONITORAGGIO di LABORATORIO

Analisi qualitativa e quantitativa della carica virale: PCR: real-time

URINE: (viruria) - “**decoy cells**”, cellule di sfaldamento dei tubuli renali che contengono inclusioni virali

- PCR quantitativa presenza di BKV-DNA

- Microscopia elettronica aggregati particelle virali

- PCR quantitativa VP1 mRNA

SANGUE: - PCR quantitativa presenza di BKV-DNA(viremia)

Comparazione: ricerca decoy cells/PCR DNA urine (Viscount et al. Transplant)

sensibilità	25%	100%	Confronto per biopsia (BKVN)
specificità	84%	78%	



PCR DNA BK (urine e sangue)

Hirsch et al (Polyomiavirus associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analysis and recommendation. Transpl. 2005)

- **Le cellule uroteliali sono i siti della latenza del virus e la riattivazione del virus-BK viene scoperta con l'iniziale comparsa delle cellule infette nelle urine**
- **Esiste una buona correlazione tra BK viruria e BK viremia**
- **Il riscontro della PCR DNA BK elevata nel plasma ha un alto valore predittivo nello sviluppo della PVAN**

Rischio della comparsa della patologia d'organo

PCR DNA BK (urine e sangue)

Babel et al. (Sustained BK Viruria as an Early Marker for the Development of BKV-Associated Nephropathy: Analysis of 4128 Urine and Serum Samples. Clin. And Translational Res. 2009 Berlin

Scopo: Analizzare il valore predittivo della BK viruria per lo sviluppo della BK viremia e considerarlo un affidabile marker di PVAN (biopsia)

Materiali e metodi:

- 1265 pazienti trapiantati
- 4128 prelievi urine e sangue

Conclusioni

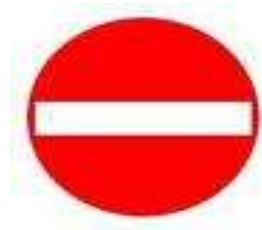
- la Bk viremia è necessaria per la diagnosi di infezione da BK
- la BK viremia è dimostrato avere un buon valore predittivo per lo sviluppo di BKVN
- la “persistente” BK viruria ha un' eccellente sensibilità (100%) e specificità (82%) per la BK viremia (“persistente” due o più esami consecutivi BK DNA) e può predire una iniziale PVAN
- con il monitoraggio della BK viruria si possono identificare i pazienti ad elevato rischio di sviluppare una PVAN

VALORI SIGNIFICATIVI

VALORE SOGLIA URINE = > 10.000.000 copie/ml

VALORE SOGLIA SANGUE = > 10.000 copie/ml
> 5.000 copie/ml (viremia) possono già indicare un alto rischio di malattia

VALORE SOGLIA mRNA-VP1 = > 650.000 copie/ng



esiste una variabilità tra le metodiche di PCR quantitativa in uso presso i vari **Centri**: ogni Centro deve effettuare una validazione interna del valore che costituisce la propria soglia del rischio



MONITORAGGIO

Il monitoraggio dell'infezione da BK è uno strumento fondamentale per identificare i pazienti a rischio di BKVN

- Ogni 3 mesi nel 1° anno
- Ogni 6 mesi nel 2° anno
- Annualmente fino al 5° anno

Se la PCR quantitativa su plasma viene utilizzata per monitorare il decorso della BKVN andrebbe effettuata **ogni 2- 4 settimane**, fino alla negativizzazione o alla riduzione al di sotto dei livelli soglia



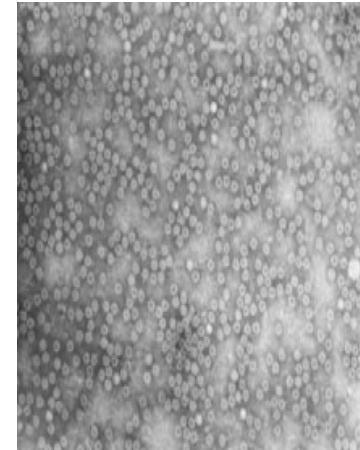
POLYOMAVIRUS: JC Virus

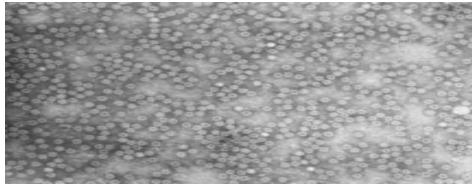
Dopo l'infezione primaria può rimanere latente nei linfociti

- **Responsabile di Leucoencefalopatia multifocale progressiva nel pz. immunocompromesso.**
- **A volte associato a casi di nefropatia interstiziale nel trapianto di rene**

PARVOVIRUS B19

- Virus ssDNA no-envelope
- Famiglia Eritrovirus
- 3 genotipi : B19 - K1- V9
(ca. 10% di differenze nucleotidiche)
immunologicamente indistinguibili
- Generalmente alte cariche virali in corso di infezione ($>10^{13}$)
- 0 – 12% infezioni nel primo anno (in genere coinfezioni)
- Trapiantati con anemia persistente 23-44%





PARVOVIRUS B19

- **Ipoplasia midollare cronica** : pazienti con deficit immunitario → infezione cronica, persistente del midollo, anemia cronica (<6 g/L Hb), neutropenia grave.
- **Microangiopatia trombotica in alcuni casi di trapianto renale**
- Assenza di risposta anticorpale.
- Presenza del DNA virale in circolo.

Test diagnostici che permettano di analizzare le diverse proprietà funzionali dei linfociti T e correlarle al controllo delle infezioni

virologico

metodiche molecolari

immunologico

Immunità cellulo-mediata (CD4+ e CD8+)
in particolare
l'immunità linfocita-T virus specifica



virologico

metodiche molecolari

Permette di seguire con maggiore efficienza la cinetica di replicazione del virus.

Informazioni utili per:

- individuare i pazienti a rischio di insorgenza della malattia
- intervenire tempestivamente con la terapia antivirale
- monitorare in maniera corretta il trattamento terapeutico.

immunologico

Lo studio della risposta cellulo-mediata virus specifica permette di individuare i pazienti in grado di controllare o meno l'infezione.

Ulteriori informazioni utili:

- per la selezione dei pazienti ad elevato rischio di insorgenza di malattia e quindi
- predisporre per questi pazienti un monitoraggio virologico più intenso ed
- una modulazione più appropriata degli interventi terapeutici immunosoppressivi per il controllo dell'infezione

GRAZIE PER L'ATTENZIONE