

Protocollo diagnostico

DIAGNOSI DI LABORATORIO DELL' INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS UMANO (HCMV) NEI TRAPIANTATI DI ORGANO SOLIDO (SOTR) E DI CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE (HSCTR)

Dott.ssa Lucia Collini - U.O. Microbiologia e Virologia

Dott. Claudio Paternoster - U.O. Malattie Infettive

Dott.ssa Danila Bassetti – U.O. Microbiologia e Virologia

Dott. Paolo Vivaldi – U.O. Ematologia

Dott. Giuliano Brunori – U.O. Nefrologia ed Emodialisi

Dott. Giovanni de Pretis - U.O. Gastroenterologia ed Endoscopia digestiva

Dott.ssa Cristina Andreotti – U.O. Nefrologia ed Emodialisi – Ambulatorio Trapianti

Dott. Ivo Aavancini – U.O. Gastroenterologia ed Endoscopia digestiva - Ambulatorio Trapianti

Dott. Paolo Lanzafame - U.O. Microbiologia e Virologia

Premessa

Il presente progetto si sviluppa nell'ambito dei programmi di attività volti a migliorare l'appropriatezza prescrittiva e analitica delle indagini di laboratorio

Scopo

Human Cytomegalovirus (HCMV) è una causa importante di morbilità e mortalità sia nei riceventi trapianto di organo solido (SOTR) sia di cellule staminali ematopoietiche (HSCTR). Nei pazienti trapiantati di organo solido come rene, cuore, fegato, polmone e pancreas *HCMV* è la principale causa di morbilità e mortalità durante i primi sei mesi dopo il trapianto. L'infezione è caratterizzata da febbre, leucopenia, trombocitopenia, con o senza disfunzione d'organo specifico.

Una diagnosi tempestiva ed accurata di infezione da *HCMV* diventa d'obbligo in queste tipologie di pazienti, da un lato per intervenire in tempi rapidi a prevenire la malattia e dall'altro per gestire in maniera corretta il paziente. Sono state adottate due strategie principali per prevenire la malattia da *HCMV*: la profilassi con agenti antivirali, o il pre-trattamento dei riceventi di organi solidi, che sviluppano evidenza di infezione durante lo screening di routine. Le ultime linee guida hanno ampiamente dimostrato che il trattamento preventivo con agenti antivirali di pazienti viremici è stato ormai adottato come alternativa alla profilassi di routine per prevenire la malattia da *HCMV*. Scopo di questo protocollo è fornire un ausilio nella diagnostica di laboratorio di infezione da *HCMV* in modo da consentire di valutare al meglio i benefici e i rischi di preventivi regimi di trattamento e profilassi con farmaci antivirali per gestire gli effetti indiretti dell'infezione (rigetto acuto, perdita dell'organo trapiantato, infezioni opportunistiche, fino a morte) nei riceventi trapianto di organo solido e di cellule staminali ematopoietiche. Nella stesura del protocollo diagnostico, con l'obiettivo finale di fornire un supporto "basato sulle evidenze", che fosse soprattutto di pratico uso nella gestione del paziente con una infezione da *HCMV*, per quanto riguarda la forza delle raccomandazioni e il livello delle evidenze, sono state seguite le Linee Guida del *Center of Control Diseases (CDC)* utilizzando il *grading* riportato nella Tabella1.

Nelle varie sezioni, quando possibile, sono state inserite con le raccomandazioni il livello di forza e di qualità della evidenza a loro supporto, basate su un *grading* espresso dalle lettere A, B, C, D e E (forza della raccomandazione) e dai numeri romani I, II e III (livello delle evidenze).

Introduzione

Human Cytomegalovirus o *Herpes virus umano tipo 5 (HCMV)*, appartiene alla famiglia delle *Herpesviridae*, sottofamiglia *Betaherpesviridae*. Il virus presenta un capsidico proteico icosaedrico composto da 162 capsomeri ed un involucro lipoproteico che racchiude un corredo genomico formato da una singola macromolecola di DNA a doppia elica lineare della lunghezza di circa 240 Kb. Le dimensioni del virus sono dell'ordine dei 180-250 nm.

Il materiale genetico si trova racchiuso in una matrice proteica ed uno strato amorfo, tutto circondato da un doppio strato lipidico contenente i complessi glicoproteici virali definito pericapside. L'infezione avviene col contatto tra le proteine cellulari dell'ospite che interagendo con le proteine virali di superficie dell'agente virale favoriscono la produzione immediata di citochine per una risposta pro-infiammatoria. *HCMV* presenta la capacità di rimanere latente, integrato nel cromosoma ospite fino a quando ad esempio un evento di stress immunitario ne fa attivare i fattori di trascrizione, attivando così la replicazione virale e quindi la trascrizione di 3 classi di mRNA: *immediate early*, *early*, *late*. La risposta immunitaria al virus è basata sia sull'immunità innata (cellule natural killer) che sull'immunità adattativa (cellule T). La risposta T cellulare citotossica CD8⁺ viene diretta quasi esclusivamente verso la proteina strutturale fosfoproteina 65, *pp65*.

Aspetti clinico-epidemiologici e patogenetici.

Human Cytomegalovirus (HCMV) è un virus ubiquitario che può determinare varie sindromi sia nell'adulto che nel bambino.

Una caratteristica peculiare del virus è la capacità di infettare una varia gamma di tipi cellulari come ad esempio le cellule epiteliali delle mucose e delle ghiandole, i fibroblasti dei tessuti connettivi, le cellule endoteliali e le cellule muscolari lisce del tratto intestinale.

L'uomo è l'unico serbatoio di diffusione del virus, la cui trasmissione da individuo a individuo avviene tramite fluidi corporei come sangue, saliva, urina, liquido seminale, secrezioni vaginali e latte. Il contagio può avvenire tramite contatto tra individui, per trasmissione congenita durante la gravidanza, durante l'allattamento per trasfusioni e trapianto di organi infetti.

La trasmissione può essere quindi verticale o orizzontale e dopo il primo contatto con il virus, ci possono essere riattivazioni, durante le quali i virioni compaiono nelle urine e nella saliva. Nei paesi sviluppati, con un elevato standard di igiene, il 70% della popolazione è venuto a contatto con il virus. *HCMV* è un virus opportunistico, in pazienti normocompetenti l'infezione raramente diventa sintomatica. Le infezioni primarie in soggetti immunocompetenti spesso sono latenti e non diagnosticate. I principali siti di infezione sembrano essere le cellule mononucleate di sangue periferico (*peripheral blood mononuclear cell*, PBMC) e le cellule endoteliali. Il virus si mantiene silente nei monociti/macrofagi e i soggetti con un'infezione latente possono, ad intermittenza, riversare il virus nei propri fluidi corporei e di conseguenza infettare altri soggetti.

Per quanto riguarda invece i pazienti con disturbi immunitari, sussiste un rischio elevato di sviluppare infezioni da *HCMV* e il virus può provocare importanti e gravi patologie in particolare agli occhi, fegato, sistema nervoso che possono indurre un'alta percentuale di morbilità e mortalità. I soggetti più a rischio sono le donne in gravidanza in quanto il virus è in grado di oltrepassare la placenta e causare gravi danni al feto, soggetti immunocompromessi come trapiantati d'organo e midollo e pazienti HIV positivi. In questi soggetti l'infezione più comunemente nasce dalla riattivazione di virus endogeno come risultato di immunosoppressione. Tra le infezioni da virus erpetici, quelle da citomegalovirus umano (*HCMV*) rappresentano un pericolo maggiore nei soggetti riceventi sia un trapianto di organo solido (SOTR) che un trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCTR). Il pericolo maggiore è rappresentato dalla polmonite, che si può verificare con maggiore frequenza nei primi tre mesi dopo il trapianto (Tabella2).

L'infezione attiva da *HCMV* (soprattutto nel paziente HSCTR) va diagnosticata molto precocemente (prima che si manifesti clinicamente) perché la terapia antivirale sia efficace.

La prevenzione dell'infezione da HCMV viene definita sulla base del gruppo di rischio a cui appartiene il ricevente da trattare e sulla base del regime immunosoppressivo al quale è sottoposto. I riceventi con un elevato rischio di infezione primaria da HCMV (D+/R-) vengono sottoposti a profilassi per i 3-6 mesi successivi al trapianto, i pazienti a basso rischio (R+) possono essere invece monitorati settimanalmente durante il follow-up post trapianto al fine di identificare e trattare tempestivamente la malattia (*preemptive therapy*).

Diagnosi di laboratorio

La diagnosi precoce d'infezione causata da HCMV riveste un ruolo molto importante per attuare le misure più adeguate per trattare o prevenire l'infezione virale.

La scelta del campione biologico più adatto per la ricerca del virus è un punto di partenza da cui non si può prescindere nella diagnosi d'infezione da HCMV. Infatti, mentre per tutte le tipologie di pazienti il materiale biologico su cui effettuare l'indagine può variare dalla saliva, alle secrezioni cervicali, latte materno, urine, plasma, per i pazienti trapiantati sia di organo solido che di midollo solo i campioni biologici che devono essere presi in considerazione sono: il sangue intero e/o il plasma per la diagnosi d'infezione sistemica e i campioni bioptici o le secrezioni per la diagnosi d'infezione d'organo.

Diagnosi di infezione attiva

La diagnosi di laboratorio di infezione attiva da HCMV si basa sulla rilevazione del virus o dei suoi prodotti nel sangue. Dalla fine degli anni '80, diverse tecniche sono state sviluppate per questo scopo: l'isolamento del virus standard del virus o rapido con la coltura cellulare su vetrino (*shell-vial*), il rilevamento di *pp65* in leucociti del sangue periferico (*pp65*-antigenemia), il rilevamento e la quantificazione del DNA virale (DNAemia). La determinazione quantitativa della carica virale nel sangue ha dimostrato avere un elevato valore prognostico per lo sviluppo della malattia in soggetti HSCTR e SOTR. Tra le diverse tecniche, anche l'isolamento virale rapido con il metodo *shell vial*, fornisce risultati quantitativi altamente correlati con il livello reale di replicazione virale e dà informazioni sulla efficacia della terapia antivirale. Ciò nonostante, i metodi basati sui test in coltura hanno un basso valore predittivo, possono impiegare da 48 ore a 3 settimane e hanno una possibilità d'uso limitata, in particolare per i pazienti immunocompromessi. E' stato anche riscontrato che mancano di sensibilità per fornire indicazioni sulla terapia *pre-emptive*. L'antigenemia, ampiamente utilizzata in passato, è ancora oggi adottata in molti centri sia per la diagnosi di infezione da HCMV sia per l'orientamento della terapia preventiva. Il dato quantitativo che fornisce si è dimostrato essere facilmente standardizzabile nella gestione dell'infezione, tuttavia l'interpretazione dei risultati rimane soggettiva e il test non è automatizzabile, in vista della necessità di gestire un numero sempre più elevato di campioni al giorno. In aggiunta, a causa delle proprietà biologiche di *pp65* (che viene sintetizzata nelle cellule endoteliali infettate e trasferita nei leucociti), la quantificazione nei polimorfonucleati non è direttamente correlata con il livello reale di replicazione virale, fornendo in casi particolari informazioni fuorvianti. Il test per la ricerca della *pp65* è laborioso, di difficile esecuzione su soggetti gravemente neutropenici e prevede che il sangue sia trattato entro sei ore dal prelievo, alla luce del fatto che l'antigenemia tende a diminuire durante la conservazione. Questi limiti vengono superati con i saggi molecolari. La quantificazione del DNA virale mediante *real-time* PCR ha dimostrato fornire risultati altamente affidabili. Il DNA virale può essere quantificato in materiali diversi, come leucociti, plasma o sangue intero, cosa che consente di determinare sia virus privo di cellule che cellula-associato. Tuttavia, dato che nei vari centri di trapianto sono utilizzati sistemi diversi, diventa fondamentale una metodologia standardizzata, uno dei motivi per cui il laboratorio di biologia molecolare aderisce ad un programma di controllo qualità che svolge periodicamente garantendo un elevato standard di qualità e riproducibilità del risultato.

La localizzazione d'organo del virus è diagnosticata esaminando biopsie di organi o, in alternativa, secrezioni, come il lavaggio broncoalveolare per l'infezione polmonare tramite tecniche di immunocistochimica e/o saggi virologici (quantificazione del DNA virale o isolamento del virus).

Per quanto riguarda invece i saggi sierologici, con la determinazione di IgG o IgM specifiche, questi non si sono rivelati essere utili nella diagnosi e successivo monitoraggio di infezione da *HCMV* in HSCTR e SOTR. La ricerca anticorpale trova infatti significato nella definizione del rischio per lo sviluppo dell'infezione quando eseguita nel donatore e nel ricevente prima del trapianto. A discapito di tale monitoraggio, è necessario valutare che bassi livelli di IgG specifiche per *HCMV* potrebbe essere rilevato in pazienti candidati al trapianto se hanno ricevuto somministrazioni di prodotti ematici o immunoglobuline, pur non avendo mai incontrato il virus.

Raccomandazioni

- La determinazione quantitativa della carica virale nel sangue è indicata in quanto ha un elevato valore prognostico per lo sviluppo della malattia da *HCMV* (AI).
- La quantificazione del DNA di *HCMV* su sangue intero è il test elettivo per il monitoraggio della carica virale, poiché correla direttamente con la replicazione virale e i sintomi clinici (AI).
- Per la diagnosi di localizzazione d'organo, devono essere esaminati una biopsia d'organo (o, in alternativa, secrezioni o il lavaggio broncoalveolare per l'infezione polmonare) (A III).

Monitoraggio virologico

Il monitoraggio della carica virale deve essere eseguito durante i primi tre mesi dopo il trapianto settimanalmente (o almeno durante i primi 2 mesi, poi ogni 2 settimane nel terzo mese).

Con un dato di DNA-emia positivo (infezione attiva da *HCMV*) il monitoraggio deve essere più frequente (2 determinazioni/settimana). Questo programma di sorveglianza costante dell'infezione è stato dimostrato in diversi studi prospettici non solo per evidenziare tempestivamente i pazienti a rischio di sviluppo di *HCMV*, ma anche per permettere in tempi rapidi l'inizio di un intervento antivirale. Oltre tre mesi dopo il trapianto, per evitare insorgenza tardiva di malattia da *HCMV*, la sorveglianza deve essere effettuata: mensilmente, nel caso di un aumento della terapia immunosoppressiva oppure sulla base di qualsiasi indicazione clinica suggestiva di infezione da *HCMV*. Nel caso di un'infezione attiva, il monitoraggio settimanale o bisettimanale non è sufficiente e andrebbe aumentato nella frequenza. Quando viene sospettata la localizzazione d'organo, i campioni da esaminare sono la biopsia d'organo o le secrezioni locali sia in presenza o in assenza di *HCMV* DNA. Nei trapiantati di polmone, il monitoraggio dell'*HCMV*-DNA viene eseguito su campioni di BAL in concomitanza con broncoscopia di routine (Figura1).

Monitoraggio immunologico

E' ampiamente accettato che nel controllo dell'infezione intervengono meccanismi di risposta immunitaria specifica cellulo-mediata. La gravità dell'infezione da *HCMV* e il grado di coinvolgimento degli organi correla con una risposta immunitaria mediata da linfociti T-CD4 + e CD8 +, mentre l'assenza di cellule T si osserva in episodi di riattivazione dell'infezione. I metodi di laboratorio per il dosaggio dei linfociti T sono molti, ma appare dal punto di vista clinico ragionevole presumere che una determinazione immunologica simultaneamente ad un *follow-up* virologico può migliorare la gestione dei pazienti trapiantati con infezione da *HCMV*, anche se diventa eccessivo in soggetti con efficiente sistema immunitario (Figura1).

Raccomandazioni

- La DNA-emia durante il primo dei tre mesi dopo il trapianto andrebbe effettuata ogni settimana.
- Con il sospetto clinico di infezione attiva da *HCMV*, il monitoraggio dovrebbe essere più frequente (2 determinazioni a settimana) (AI).
- Dopo tre mesi dal trapianto, per evitare l'insorgenza di malattia tardiva, il monitoraggio della carica virale deve essere effettuato mensilmente (IIB).
- Nei **soggetti HSCTR** il metodo di scelta per la prevenzione delle malattie *HCMV* è la strategia preventiva, la profilassi dovrebbe essere adottata solo in centri dove non può essere effettuato il monitoraggio virologico (A II).

- Alcuni studi indicano di iniziare la terapia *pre-emptive* con un livello DNAemia di 4 log₁₀ (10.000) copie/ml di sangue. La terapia deve essere protratta fino a DNAemia negativa (AI).
- La DNAemia su sangue intero deve essere effettuata ogni settimana durante il primo dei tre mesi dopo il trapianto. Con infezione attiva il monitoraggio deve essere più frequente (2 determinazioni/settimana) (AI).
- Oltre tre mesi dopo il trapianto, per evitare insorgenza tardiva di malattia, il monitoraggio deve essere effettuato mensilmente (II B).
- Nei **soggetti SOTR** il metodo di elezione per la prevenzione delle malattie HCMV è la terapia preventiva (II A).
- La terapia deve essere iniziata dopo aver raggiunto un livello di DNAemia oltre 100.000 copie / ml di sangue e continuare fino a negatività della DNAemia. Lo stesso cutoff può essere usato per le infezioni primarie e ricorrenti (AI).
- Il monitoraggio del viral load nel BAL dei trapiantati di polmone è suggerito (B III).
- Le strategie di prevenzione ottimale dovrebbe essere determinata in particolari popolazioni di pazienti, come i trapiantati multi viscerale.

Farmacocinetica e meccanismi di resistenza ai farmaci.

In caso di persistenza di DNAemia (o viremia) sono consigliati saggi di farmaco-resistenza. Va sottolineato, tuttavia, che un aumento dell'antigenemia durante i primi 10-15 giorni di trattamento (non accompagnato da un concomitante aumento di DNAemia e dei livelli di viremia) non indica fallimento della terapia, ma, come nelle infezioni primarie di SOTR, è dovuto ad un eccesso *pp65* sintesi durante la replicazione virale. La mancanza di un trattamento antivirale efficace può verificarsi anche in assenza di mutazioni nel genoma virale. In tali casi si impone una valutazione della concentrazione plasmatica di farmaco e conseguentemente una rivalutazione del regime di terapia immunosoppressiva.

Raccomandazioni

- In caso di infezione da *HCMV*, il trattamento antivirale deve proseguire fino a scomparsa del virus dal sangue o dall'organo coinvolto (II A).
- In caso di aumento di DNAemia durante il trattamento, deve essere verificata una possibile resistenza al farmaco (A III).

Tabella1. Recommendations and grading according to the United States Centers for Disease Control (adapted from Gross et al., 1994)

Strength of recommendations	
A	Strong evidence for efficacy and substantial clinical benefit. Strongly recommended.
B	Strong or moderate evidence for efficacy, but only limited clinical benefit. Generally recommended.
C	Insufficient evidence for efficacy; or efficacy does not outweigh possible adverse consequences or costs of chemoprophylaxis or alternative approaches.
D	Moderate evidence against efficacy or of adverse outcome. Generally not recommended.
E	Strong evidence against efficacy or of adverse outcome. Never recommended.
Quality of evidence supporting recommendation.	
I	Consistent evidence from controlled clinical trial(s). Evidence from at least one well designed randomized trial and, in case of laboratory studies, consistent evidence from comparative studies.
II	Evidence from at least one well-designed clinical trial without randomization, from cohort or case-controlled analytical studies (preferably from more than one centre), or from multiple time-series studies or dramatic evidence from uncontrolled experiments.
III	Evidence from opinion of respected authorities based on clinical experience, descriptive studies or reports from expert committees.

Tabella2. Sistemc syndrome and a end organ-disease

	Systemic syndrome	End-organ disease
Sintomi e segni clinici	-Febbre >38°C -Leucopenia -Trombocitopenia -Transaminasi epatiche >2 volte il range (esclusi i trapiantati di fegato)	-Coinvolgimento d'organo (polmone, fegato, apparato gastrointestinale e nervoso)
Dato di laboratorio	-IgM/IgG sieriche positive -HCMV DNA nel plasma	-HCMV DNA nel plasma -HCMV nelle biopsie tissutali

Sintesi

In relazione ai diversi tipi di trapianto e ai protocolli di immunosoppressione è possibile, sulla base della determinazione quantitativa di *HCMV* ed il riconoscimento di specifici valori di cut-off predittivi per lo sviluppo di malattia, iniziare terapie farmacologiche antivirali mirate prima della comparsa della sintomatologia clinica (“*terapia pre-emptive*”). Per questo i saggi di sorveglianza devono essere prontamente disponibili, rapidi, sensibili e specifici per identificare una infezione precoce da *HCMV*. Attualmente non ci sono criteri universalmente concordati per il livello di viremia che richiede un trattamento o per il test di sorveglianza più appropriato. Tuttavia negli ultimi tempi sono comparse diverse pubblicazioni e linee guida internazionali (International Herpes Management Forum) relative all'introduzione di metodi molecolari per la sorveglianza delle infezioni da *HCMV*. In tale ambito anche presso la nostra Unità Operativa sono stati messi a punto protocolli diagnostici per la determinazione quantitativa di *HCMV*-DNA mediante “Real-Time PCR”. I test molecolari rispetto alla determinazione di *pp65* sono caratterizzati da maggiore sensibilità, migliore standardizzazione e permettono un più preciso controllo dell'efficacia terapeutica. La definizione di valori soglia di *viral load* come parametro guida del trattamento ha già generato e continua a fornire risultati di grande impatto clinico per la terapia delle infezioni da virus erpetici. I risultati positivi al DNA di *HCMV* nel plasma ottenuti con la tecnica PCR dimostrano una buona correlazione con la positività all'antigenemia e con l'aumento del rischio di sviluppare la patologia sistemica da *HCMV*. Diversi studi hanno dimostrato l'associazione tra carica virale e il rischio di sviluppare malattia. Studi condotti su trapiantati di organi e malati di AIDS hanno dimostrato che la rilevazione del DNA di *HCMV* tramite PCR è altamente predittiva del successivo decorso ed esito clinico della malattia. Valutazioni quantitative dei livelli di DNA hanno dimostrato come cariche virali elevate e un aumento della carica virale nel corso del tempo siano associati a prognosi cliniche più sfavorevoli per una serie di condizioni di rischio correlate al virus. Inoltre i test molecolari quantitativi consentono il monitoraggio dell'efficacia della terapia antivirale e la valutazione indiretta della resistenza virale. La refertazione della carica virale è raccomandata nelle attuali linee guida per il trattamento dei trapiantati di organi solidi (per monitorare i pazienti che rischiano di sviluppare la patologia da *HCMV* e che necessitano di un'adeguata profilassi) e a scopo terapeutico per il monitoraggio dei pazienti con malattia attiva. È inoltre raccomandato come uno dei criteri diagnostici per l'identificazione della malattia nei trapiantati di cellule staminali ematopoietiche. La definizione di valori soglia di *viral load* come parametro guida del trattamento ha come obiettivo primario l'adozione di interventi di tipo terapeutico o preventivo che possano essere eseguiti prima della comparsa di sintomi clinici con terapia presintomatica o *preemptive*. Nel caso delle infezioni da *HCMV*, si tratta infatti di stabilire dei valori soglia di *viral load*, al di sopra dei quali è opportuno iniziare subito il trattamento antivirale, ma al sotto dei quali il trattamento può essere omesso risolvendosi l'infezione spontaneamente. Così il trattamento viene iniziato quando la PCR diventa positiva (>1000 copie) per la prima volta. È obbligatorio confermare la positività PCR con un campione ripetuto entro 48 ore. In un paziente trapiantato il valore di positività è considerato quando > 500 copie. Tuttavia, in questo caso il risultato deve essere confermato entro 48-72 ore prima di iniziare la terapia. Se la PCR oscilla tra positivo e negativo andrebbe impostato un individualizzato piano di trattamento. Alcune linee guida, tra cui il British Transplantation Society (BTC 2004), la Cura per gli australiani con insufficienza renale (CARI 2004) e la Società Malattie Infettive d'America (IDSA2005), sostengono che il trattamento preventivo ha dimostrato di ridurre il rischio di malattia da *HCMV* nei pazienti trapiantati di organo solido, anche se i dati sono molto pochi, rispetto alla prassi attuale che è la profilassi antivirale di routine per tutti (ad eccezione di destinatari sieronegativi e di donatori sieronegativi). Pertanto il trattamento preventivo è una strategia promettente per la prevenzione delle malattie da *HCMV* oltre che una ottima strategia di contenimento dei costi. Non va inoltre sottovalutato che solo con la terapia *pre-emptive* è possibile limitare l'inutile esposizione ad agenti antivirali con i potenziali effetti avversi.

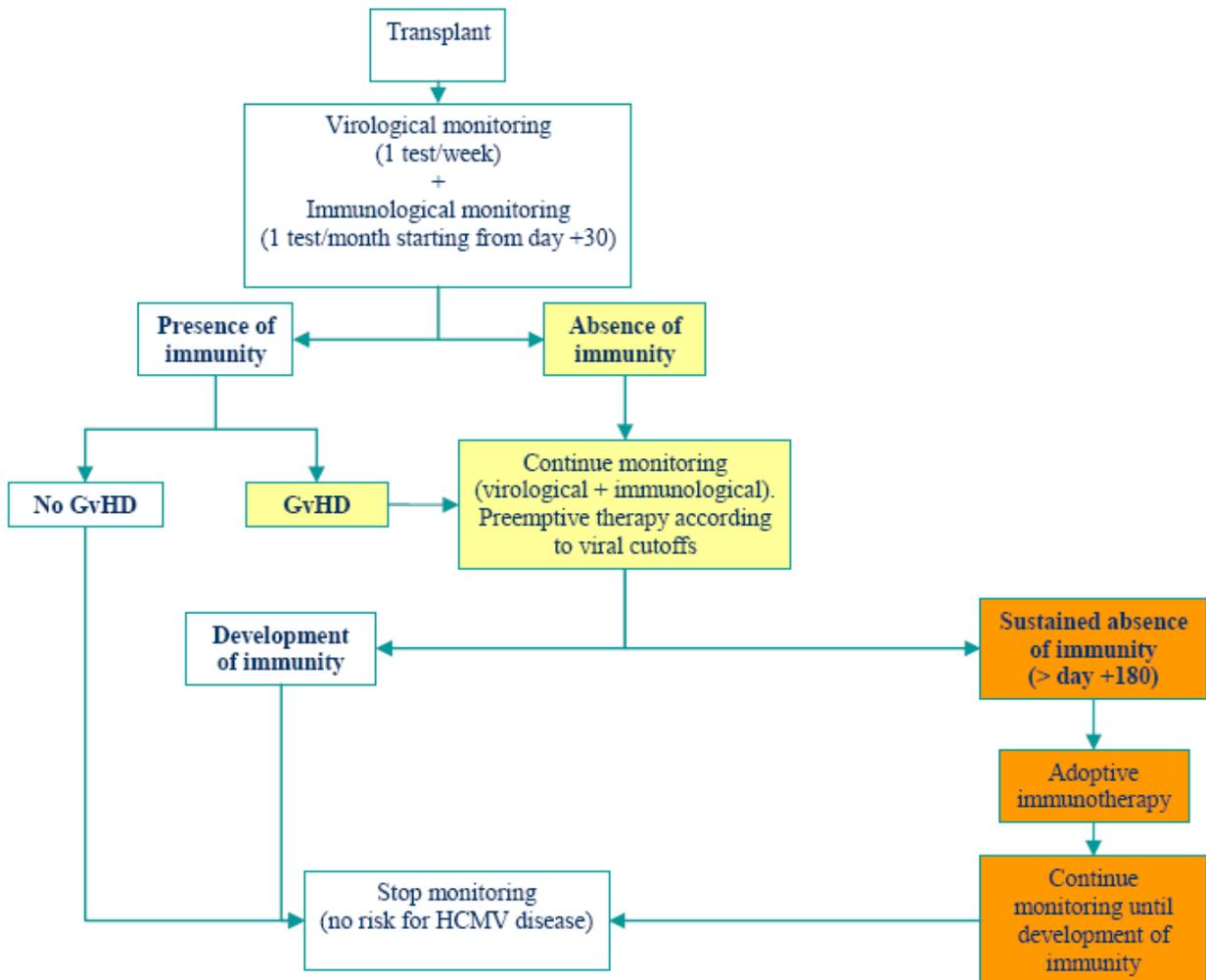


Figura1. Monitoraggio virologico e immunologico per rilevare l'infezione da *HCMV* dopo il trapianto: con risposta immunitaria a *HCMV*, in assenza di GvHD, i pazienti sono a rischio di malattie *HCMV* (la sorveglianza *HCMV* può essere interrotta). Senza una risposta delle cellule T, con trattamento con steroidi per GvHD, il monitoraggio va proseguito o ripristinato. I pazienti senza risposta immunitaria specifica sono candidati per l'immunoterapia adottiva.

Bibliografia

1. Philippe Halfon et all., 2011, "Algorithm based on CMV kinetics DNA viral load for preemptive therapy initiation after hematopoietic cell transplantation", Journal of Medical Virology
2. Jayant S.Kalpoet et all., 2004 "Validation of clinical application of cytomegalovirus plasma DNA load measurement and definition of treatment criteria by analysis of correlation to antigen detection")
3. Gerna G, Sarasini A, Lilleri D, Percivalle E, Torsellini M, Baldanti F, Revello MG. In vitro model for the study of the dissociation of increasing antigenemia and decreasing DNAemia and viremia during treatment of human cytomegalovirus infection with ganciclovir in transplant recipients. J Infect Dis. 2003;188:1639-47.

4. Gerna G, Lilleri D, Zecca M, Alessandrino EP, Baldanti F, Revello MG, Locatelli F. Rising antigenemia levels may be misleading in pre-emptive therapy of human cytomegalovirus infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Haematologica*. 2005;90:526-33.
5. Mengelle C, Sandres-Saune K, Pasquier C, Rostaing L, Mansuy JM, Marty M, Da Silva I, Attal M, Massip P, Izopet J. Automated extraction and quantification of human cytomegalovirus DNA in whole blood by real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2003;41:3840-5.
6. Lilleri D, Gerna G, Fornara C, Chiesa A, Comolli G, Zecca M, Locatelli F. Human cytomegalovirus-specific T cell reconstitution in young patients receiving T cell-depleted, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Dis*. 2009;199:829-36.
7. Hakki M, Riddell SR, Storek J, Carter RA, Stevens-Ayers T, Sudour P, White K, Corey L, Boeckh M. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood*. 2003;102:3060-7.
8. Gerna G, Lilleri D, Baldanti F, Torsellini M, Giorgiani G, Zecca M, De Stefano P, Middeldorp J, Locatelli F, Revello MG. Human cytomegalovirus immediate-early mRNAemia versus pp65 antigenemia for guiding pre-emptive therapy in children and young adults undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a prospective, randomized, open-label trial. *Blood*. 2003;101:5053-60.
9. Ljungman P, Perez-Bercoff L, Jonsson J, Avetisyan G, Sparrelid E, Aschan J, Barkholt L, Larsson K, Winiarski J, Yun Z, Ringdén O. Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2006;91:78-83.
10. Lilleri D, Gerna G, Furione M, Bernardo ME, Giorgiani G, Telli S, Baldanti F, Locatelli F. Use of a DNAemia cut-off for monitoring human cytomegalovirus infection reduces the number of pre-emptively treated children and young adults receiving haematopoietic stem cell transplantation as compared to qualitative pp65-antigenemia. *Blood*. 2007;110:2757-60.
11. Gerna G, Lilleri D, Caldera D, Furione M, Zenone Bragotti L, Alessandrino EP. Validation of a DNAemia cutoff for pre-emptive therapy of cytomegalovirus infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41:873-9.
12. Mattes FM, Hainsworth EG, Geretti AM, Nebbia G, Prentice G, Potter M, Burroughs AK, Sweny P, Hassan-Walker AF, Okwuadi S, Sabin C, Amooty G, Brown VS, Grace SC, Emery VC, Griffiths PD. A randomized, controlled trial comparing ganciclovir to ganciclovir plus 15 foscarnet (each at half dose) for preemptive therapy of cytomegalovirus infection in transplant recipients. *J Infect Dis*. 2004;189:1355-61.
13. van der Heiden PL, Kalpoe JS, Barge RM, Willemze R, Kroes AC, Schippers EF. Oral valganciclovir as pre-emptive therapy has similar efficacy on cytomegalovirus DNA load reduction as intravenous ganciclovir in allogeneic stem cell transplantation recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2006;37:693-8.
14. Winston DJ, Baden LR, Gabriel DA, Emmanouilides C, Shaw LM, Lange WR, Ratanatharathorn V. Pharmacokinetics of ganciclovir after oral valganciclovir versus intravenous ganciclovir in allogeneic stem cell transplant patients with graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12:635-40.
15. Einsele H, Reusser P, Bornhauser M, Kalhs P, Ehninger G, Hebart H, Chalandon Y, Kroger N, Hertenstein B, Rohde F. Oral valganciclovir leads to higher exposure to ganciclovir than intravenous ganciclovir in patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2006;107:3002-8.
16. Busca A, de Fabritiis P, Ghisetti V, Alice T, Mirabile M, Gentile G, Locatelli F, Falda M. Oral valganciclovir as preemptive therapy for cytomegalovirus infection post allogeneic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2007; 9:102-7.

17. Verkruyse LA, Storch GA, Devine SM, Dipersio JF, Vij R. Once daily ganciclovir as initial preemptive therapy delayed until threshold CMV load $>$ or $=10,000$ copies/ml: a safe and effective strategy for allogeneic stem cell transplant patients. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 37:51-6.
18. Lozza L, Lilleri D, Percivalle E, Fornara C, Comolli G, Revello MG, Gerna G. Simultaneous quantification of human cytomegalovirus (HCMV)-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells by a novel method using monocyte-derived HCMV-infected immature dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2005;35:1795-804.
19. Lilleri D, Gerna G, Fornara C, Lozza L, Maccario R, Locatelli F. Prospective simultaneous quantification of human cytomegalovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell reconstitution in young recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Blood.* 2006;108:1406-12.
20. Avetisyan G, Aschan J, Hägglund H, Ringdén O, Ljungman P. Evaluation of intervention strategy based on CMV-specific immune responses after allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2007;40:865-9.
21. Lilleri D, Zelini P, Chiesa A, Comolli G, Rognoni V, Mastronuzzi A, Locatelli F, Gerna G. Management of HCMV infection in haematopoietic stem cell transplant recipients by simultaneous virological and immunological monitoring. An interim analysis. 12th International CMV/BetaHerpesvirus Workshop, 2009. Abstract Book (Abstract no. X)
22. Gerna G, Baldanti F, Grossi P, Locatelli F, Colombo P, Viganò M, Revello MG. Diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Rev. Med. Microbiol.* 2001;12:155-75,.
23. Razonable RR, Paya CV, Smith TF. Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 2002;40:746-52.
24. Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD. Application of viral load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet.* 2000;355:2032-6.
25. Gerna G, Percivalle E, Baldanti F, Sozzani S, Lanzarini P, Genini E, Lilleri D, Revello MG. Human cytomegalovirus replicates abortively in polymorphonuclear leukocytes after transfer from infected endothelial cells via transient microfusion events. *J Virol.* 2000;74:5629-38.
26. Gerna G, Baldanti F, Lilleri D, Parea M, Torsellini M, Castiglioni B, Vitulo P, Pellegrini C, Viganò M, Grossi P, Revello MG. Human cytomegalovirus pp67 mRNAemia versus pp65 antigenemia for guiding preemptive therapy in heart and lung transplant recipients: a prospective, randomized, controlled, open-label trial. *Transplantation.* 2003;75:1012-9.
27. Gerna G, Baldanti F, Torsellini M, Minoli L, Viganò M, Oggionni T, Rampino T, Castiglioni B, Goglio A, Colledan M, Mammana C, Nozza F, Lilleri D and the Bergamo Transplant Group. Evaluation of cytomegalovirus DNAemia versus pp65-antigenaemia cutoff for guiding preemptive therapy in transplant recipients: a randomized study. *Antivir Ther.* 2007;12:63-72.
28. Gerna G, Vitulo P, Rovida F, Lilleri D, Pellegrini C, Oggionni T, Campanini G, Baldanti F, Revello MG. Impact of human metapneumovirus and human cytomegalovirus versus other respiratory viruses on the lower respiratory tract infections of lung transplant recipients. *J Med Virol.* 2006;78:408-16. Erratum in: *J Med Virol.* 2008;80:1869.
29. Rowshani AT, Bemelman FJ, van Leeuwen EM, van Lier RA, ten Berge IJ. Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation.* 2005;79:381-6.
30. Limaye AP, Bakthavatsalam R, Kim HW, Randolph SE, Halldorson JB, Healey PJ, Kuhr CS, Levy AE, Perkins JD, Reyes JD, Boeckh M. Impact of cytomegalovirus in organ

- transplant recipients in the era of antiviral prophylaxis. *Transplantation*. 2006;81: 31. 1645-52.
31. Singh N. Antiviral drugs for cytomegalovirus in transplant recipients: advantages of preemptive therapy. *Rev Med Virol*. 2006;16:281-7.
 32. Khoury JA, Storch GA, Bohl DL, Schuessler RM, Torrence SM, Lockwood M, Gaudreault-Keener M, Koch MJ, Miller BW, Hardinger KL, Schnitzler MA, Brennan DC. Prophylactic versus preemptive oral valganciclovir for the management of cytomegalovirus infection in adult renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2006;6:2134-43.
 33. Diaz-Pedroche C, Lumbreras C, San Juan R, Folgueira D, Andres A, Delgado J, Meneu JC, Morales JM, Moreno-Elola A, Hernando S, Moreno-Gonzalez E, Aguado JM. Valganciclovir preemptive therapy for the prevention of cytomegalovirus disease in high-risk seropositive solid-organ transplant recipients. *Transplantation*. 2006;82:30-5.
 34. Lopau K, Greser A, Wanner C. Efficacy and safety of preemptive anti-CMV therapy with valganciclovir after kidney transplantation. *Clin Transplant*. 2007;21:80-5.
 35. Asberg A, Humar A, Rollag H, Jardine AG, Mouas H, Pescovitz MD, Sgarabotto D, Tuncer M, Noronha IL, Hartmann A; VICTOR Study Group. Oral valganciclovir is noninferior to intravenous ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*. 2007;7:2106-13.
 36. Baldanti F, Lurain N, Gerna G. Clinical and biologic aspects of human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. *Hum Immunol*. 2004;65:403-9.