

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOPATOLOGIA DELL'INSUFFICIENZA RENALE
Ciclo XIX**

**IL TRATTAMENTO PRE-EMPTIVE DELL'INFEZIONE
DA CMV NEI PRIMI SEI MESI DI TRAPIANTO: EFFETTI
SULL'INSORGENZA DI DIABETE MELLITO (PTDM) E
DI RIGETTO ACUTO**

Coordinatore:

Ch.mo Prof.
Carlo Buzio

RELATORE

Ch.mo Prof
Massimo Sabbatini

DOTTORANDA

Annalisa Rosanna Ragosta

INDICE

1. Introduzione	Pag. 2
2. Pazienti e Metodi	Pag. 36
3. Risultati	Pag. 40
4. Discussione	Pag. 43
5. Bibliografia	Pag. 55

Introduzione

Eziologia e Peculiarità

Il citomegalovirus (CMV) è un virus appartenente alla famiglia Herpesviridae, specificamente della sottofamiglia degli β -Herpesvirinae. Esso è costituito da un capside proteico di forma cubica e dal core costituito da un doppio filamento di DNA entrambi avvolti da un involucro lipoproteico.

Il CMV ha il genoma più grande di tutti gli altri virus essendo costituito da 235 paia di basi che codificano per più di 200 proteine. Molte di queste hanno un ruolo critico nel ciclo di replicazione, mentre altre interferiscono nei meccanismi cellulari alla base delle difese immunitarie dell'ospite.

Caratteristica del virus è di avere uno spettro d'ospite ristretto, un ciclo replicativo lento e di indurre una latenza in diversi tipi di cellule dopo l'infezione primaria, riattivandosi a distanza di mesi o di anni. Durante il periodo di latenza, fungono da reservoir del virus le seguenti cellule:

- ✍ linfociti
- ✍ monociti
- ✍ granulociti
- ✍ cellule endoteliali
- ✍ cellule epiteliali
- ✍ cellule muscolari lisce
- ✍ fibroblasti

Il CMV persiste nelle cellule target grazie ad una serie di strategie che lo rendono invisibile ai linfociti T helper, alle cellule NK

ed alle cellule produttrici di anticorpi oppure permettono di eludere le risposte di tali cellule.

La riattivazione del virus avviene nel corso di processi infiammatori o quando si riducono le difese immunitarie dell'ospite e in questi casi il virus inizia la sua replicazione all'interno della cellula ospite con conseguenti effetti citotossici.

Epidemiologia e Patogenesi

Il 40-80% degli individui nei paesi industrializzati e la quasi totalità degli individui nei paesi in via di sviluppo vanno incontro ad infezione da CMV che, nei soggetti con buone funzioni immunitarie, decorre di norma in modo asintomatico.

Le infezioni sintomatiche sono appannaggio di determinate categorie di soggetti nei quali il sistema immunitario non risponde agli stimoli antigenici per motivi fisiologici (neonati o anziani), farmacologici (pazienti trapiantati in trattamento immunosoppressivo) o per motivi legati a patologie specifiche (ad esempio pazienti con infezione da HIV).

E'ovvio, quindi, che la necessità di ricorrere alla terapia immunosoppressiva predisponga i pazienti sottoposti a trapianto d'organo all'infezione da CMV; in questi pazienti l'infezione può

essere il risultato di una riattivazione del virus “dormiente”, già presente nell’organismo e verso il quale il paziente ha già sviluppato anticorpi (paziente “positivo”) o, al contrario, può essere un’infezione “*de novo*” legata al trapianto di un organo proveniente da un donatore “positivo” (che quindi possiede il virus latente nelle sue cellule) in un ricevente che può essere sia positivo che negativo. In entrambi i casi il virus attacca le cellule prima citate dove si attiva dando inizio alla sua replicazione, ma da un punto di vista clinico il rischio maggiore si riscontra quando un ricevente di trapianto sieronegativo per il virus riceve un organo da un individuo sieropositivo per il CMV: in questi pazienti il passaggio dalla semplice infezione alla vera e propria malattia è particolarmente frequente se non si adottano tempestive misure terapeutiche.

Le cellule infettate assumono grandi dimensioni per la presenza di voluminose inclusioni intranucleari eosinofile molto spesso accompagnate da inclusioni citoplasmatiche granulari, da cui deriva il nome del virus.

Le inclusioni intranucleari, del diametro di 8-10 μ m, hanno localizzazione eccentrica, comprimono lateralmente la cromatina, si circondano di un alone chiaro e producono il caratteristico aspetto ad *“occhio di gufo”*.

Dalle cellule di prima replicazione il virus diffonde alle cellule contigue e ciò si traduce in una diffusione localizzata dell'infezione all'interno di un organo o tessuto. Da questa sede il virus può arrivare sino all'endotelio ed iniziare a replicarsi nelle cellule endoteliali che sono completamente permissive alla replicazione virale. Le cellule endoteliali infettate producono citochine e fattori chemiotattici che

aumentano la capacità di adesione dei leucociti polimorfonucleati e dei monociti. Il virus penetra così nei monociti adesi alle cellule endoteliali infette e lì instaura una fase di latenza della replicazione cellulare, grazie alla trascrizione precocissima di alcuni mRNA specifici. Inoltre, il virus viene fagocitato dalle cellule polimorfonucleate e la proteina della matrice virale pp65 (ppUL83), provvista di forti segnali di trasporto intranucleare, viene rapidamente trasferita nei nuclei cellulari, mentre il resto della particella virale viene sottoposto lentamente a degradazione. In questo modo l'infezione da una fase di diffusione localizzata può passare ad una fase di diffusione ematica più generalizzata attraverso la quale il virus raggiunge i più svariati organi e tessuti.

La risposta infiammatoria dell'ospite si traduce nella comparsa di plasmacellule, linfociti e monociti-macrofagi ed in qualche caso si

sviluppa una reazione granulomatosa, come avviene soprattutto nel fegato.

L'infezione primaria nel soggetto immunocompetente decorre in maniera asintomatica grazie alla comparsa di anticorpi e all'attivazione dell'immunità cellulo-mediata. Quest'ultima sembra svolgere il ruolo più importante, come dimostra lo sviluppo di malattia in soggetti dotati di elevati titoli anticorpali, ma portatori di difetti della risposta cellulo-mediata (trapiantati trattati con farmaci immunosoppressivi, pazienti affetti da linfoma di Hodgkin, leucemie, AIDS etc.).

Diagnosi

Nel paziente trapiantato, l'esame obiettivo e la sintomatologia clinica non sono sempre sufficienti ad accertare un'infezione virale attiva in quanto essa è asintomatica nella fasi iniziali e purtroppo anche il dosaggio delle immunoglobuline specifiche (IgG e IgM) non è di chiaro aiuto nella diagnosi. Il titolo anticorpale, infatti, viene valutato al momento del trapianto sia nel donatore che nel ricevente, ma unicamente per definire il rischio di infezione e per documentare la eventuale sieroconversione di un paziente precedentemente sieronegativo. Infatti, bisogna ricordare che il titolo anticorpale aumenta solo 3-4 settimane dopo l'infezione primaria negli individui immunocompetenti, per poi rimanere elevato per anni. Inoltre, gli anticorpi di classe IgM possono permanere a lungo in circolo quando l'infezione primaria è trascorsa da tempo, laddove questi anticorpi

possono non comparire affatto durante la fase acuta di malattia nel paziente immunocompromesso.

Nel paziente trapiantato bisogna quindi necessariamente disporre di mezzi diagnostici che diano informazioni circa i fattori di predittività per la comparsa di malattia, i fattori per il controllo della progressione della malattia e che permettano di controllare l'efficacia della terapia antivirale o la sua eventuale resistenza. Fortunatamente, oggi disponiamo di sensibili test diagnostici quantitativi e questo è di grande aiuto clinico dal momento che l'entità della viremia è direttamente proporzionale alla gravità dell'infezione/malattia da CMV (1).

Nelle forme con viremia asintomatica e nelle forme lievi o moderate la diagnosi di malattia da CMV viene fatta attraverso i tests

sierologici ed attraverso l'identificazione del virus in replicazione nel sangue periferico.

Gli esami sierologici utilizzati per la diagnosi di malattia acuta da CMV sono:

- ? determinazione di un aumento del titolo anticorpale delle IgG specifiche dirette contro il CMV
- ? ricerca di anticorpi specifici di classe IgM diretti contro il CMV.

I test sierologici hanno scarso valore diagnostico.

L'identificazione del virus nel sangue periferico si realizza con la dimostrazione della viremia attraverso:

- ? L'evidenziazione diretta degli antigeni precoci (Ag pp65) del CMV nei leucociti periferici

? Determinazione della quantità di DNA del CMV nel sangue periferico (plasma) attraverso la tecnica della PCR

Nella fase post-trapianto queste indagini altamente sensibili e specifiche, permettono una diagnosi precoce di infezione e danno indicazioni circa la possibilità di effettuare una terapia mirata verso il virus quando ancora non si è sviluppata la malattia da CMV, ma sono presenti i fattori di rischio e di predittività per la sua comparsa (trattamento “pre-emptive”).

La metodica della rilevazione dell’antigene precoce del CMV si basa sulla ricerca della fosfoproteina strutturale “pp65” del CMV nei nuclei dei leucociti del sangue periferico, verso i quali questa proteina è dotata di spiccato tropismo. Il campione di sangue deve essere sottoposto all’analisi con rapidità (entro 5 ore dal prelievo) in quanto è

stato dimostrato come un ritardo può comportare una marcata e sensibile riduzione del numero di cellule positive.

Il metodo si basa su quattro passaggi essenziali:

1. separazione dei polimorfonucleati del sangue periferico con destrano e preparazione di vetrini
2. fissazione e permeabilizzazione dei polimorfonucleati
3. rivelazione dell'antigene pp65 con l'immunofluorescenza
4. lettura e quantizzazione del risultato.

Diversi lavori fanno ritenere che un numero di 50-100 cellule positive su 200.000 polimorfonucleati osservati possa rappresentare un importante parametro predittivo di malattia nei trapianti di organo solido.

I vantaggi dell'antigenemia sono l'ottima sensibilità e specificità con costi di materiale contenuti.

Gli svantaggi sono principalmente dovuti alla laboriosità della tecnica stessa, al tempo ristretto di processazione del campione e alla lettura soggettiva dei vetrini.

La metodica della PCR quantitativa si basa sulla determinazione della quantità di DNA del CMV nel sangue periferico e quindi permette una misura quantitativa della carica virale.

La PCR quantitativa presenta alcuni vantaggi rispetto all'antigenemia pp65:

1. permette di identificare un'infezione acuta più precocemente rispetto all'evidenziazione degli antigeni precoci nei leucociti periferici.
2. ha una maggiore sensibilità.

3. il metodo presenta una minore laboriosità.
4. è possibile utilizzare campioni precedentemente congelati.

La metodica viene utilizzata anche per seguire nel corso del tempo la risoluzione di un episodio infettivo e per stabilire quando interrompere la terapia antivirale (2).

Nella malattia da CMV con interessamento d'organo, la diagnosi di certezza viene ottenuta esclusivamente con l'esame istopatologico che dovrà dimostrare l'aspetto ad **“occhio di gufo”** delle cellule infettate nei frammenti bioptici.

Sintomatologia

L'infezione da CMV compare solitamente nei primi tre-sei mesi del post-trapianto e può manifestarsi o come una semplice viremia asintomatica o come vera e propria malattia con 2 diverse espressioni cliniche:

- 1) Forma mononucleosica
- 2) Forma disseminata

La forma mononucleosica è una sindrome virale caratterizzata da febbre per almeno due giorni associata ad astenia, artromialgie, leucopenia, lieve linfocitosi atipica ed a volte trombocitopenia. Il quadro clinico è caratterizzato inoltre da un lieve aumento delle transaminasi e dalla determinazione dell'aumento della carica virale da CMV a livello ematico.

La forma disseminata è una malattia in cui alla febbre si associano manifestazioni cliniche più o meno evidenti di danno di uno o più organi con relative modifiche dei test di laboratorio.

Molto spesso il danno d'organo si localizza all'organo trapiantato e possono comparire a carico di quest'ultimo le seguenti manifestazioni:

- ? Epatite e sindrome da scomparsa dei dotti biliari
nel trapianto di fegato
- ? Pancreatite nel trapianto di pancreas
- ? Polmonite interstiziale e bronchiolite obliterante
nel trapianto di polmone
- ? Aterosclerosi precoce nel trapianto cardiaco
- ? Nefropatia cronica e/o rigetto acuto nel trapianto di rene.

Diversi fattori di rischio condizionano l'insorgenza di malattia

da CMV e tra essi vanno citati i seguenti:

- ? lo stato sierologico: donatore positivo e ricevente negativo al momento del trapianto (D+R?)
- ? il protocollo immunosoppressivo (tipo di farmaco, dose, durata, terapia duplice o triplice)
- ? altri fattori indipendenti (età, comorbidità, neutropenia) (3).

L'uso di sieri policlonali e monoclonali antilinfocitari (ATG-OKT3) nella terapia d'induzione e nella terapia di rigetto acuto è associato ad un'alta incidenza di malattia da citomegalovirus (4).

Il rischio diventa massimo quando questi sieri sono usati per il trattamento del rigetto ; in questo caso la malattia da CMV si

manifesta 3 o 4 volte più frequentemente rispetto ai pazienti che non sono trattati con questa terapia.

Il rischio di sviluppare la malattia da CMV dipende anche dal tipo di trapianto. I riceventi di un trapianto di polmone o di pancreas sono a più alto rischio di sviluppare la malattia rispetto ai riceventi di fegato o rene. Questo può essere dovuto al grado di immunosoppressione utilizzato ed alla carica virale presente nel graft trapiantato.

La co-infezione con altri virus quali HHV 6 e 7, può essere un importante fattore di rischio per la malattia da CMV (4).

Terapia

La terapia della malattia da CMV è eziologica e richiede l'utilizzo di farmaci antivirali e in casi selezionati quello delle globuline iperimmuni anti CMV, nonostante l'efficacia di queste immunoglobuline non sia universalmente provata ed accettata.

Gli antivirali attualmente disponibili sono:

1. L'**Acyclovir** ed i suoi derivati (quali il valacyclovir). Essi non vengono utilizzati per il trattamento della malattia ma solo per la profilassi.
2. Il **Ganciclovir**

Allo stato attuale è il farmaco di scelta. Viene utilizzato per la profilassi dei pazienti ad alto rischio D?R? al dosaggio di 5mg/kg/e.v. x 2/die per un periodo di sei giorni (secondo le linee guida della Società Internazionale di Nefrologia), seguito

dal valganciclovir (suo derivato, vedi dopo) alla dose di 900 mg/die per os per un periodo di 12-14 settimane; il dosaggio di tali farmaci va valutato tenendo conto della funzione renale poiché entrambi hanno una escrezione prevalentemente renale.

Le linee guida internazionali prevedono che anche i riceventi sieropositivi trattati con ATG o OKT3 per l'induzione o per il trattamento del rigetto acuto ricevano la profilassi: di solito ganciclovir 5 mg/kg due volte al dì durante il periodo della terapia anticorpale (range 4-10 giorni).

Infine, negli studi comparativi della terapia, nella profilassi tra acyclovir e ganciclovir è stata dimostrata la minore efficacia del primo (5).

Secondo le linee guida della Società Internazionale di Nefrologia il ganciclovir viene utilizzato anche per il trattamento pre-emptivo e per la malattia da CMV (vedi dopo).

3. Il Valganciclovir

È un derivato valinico del ganciclovir che fornisce un'eccellente biodisponibilità per via orale molto simile a quella raggiungibile con ganciclovir dopo somministrazione per via e.v. Uno studio ha dimostrato che l'Area sotto la curva (AUC) del valganciclovir, determinata a differenti tempi dopo il trapianto, è 1,65 volte più alta dell'AUC del ganciclovir quando somministrato per via orale (6).

Nella pratica clinica in profilassi viene favorito l'uso del valganciclovir per la facile somministrazione per via orale con un numero contenuto di compresse ed è attualmente approvato

in Nord America e in Europa per la profilassi di riceventi d'organo ad alto rischio.

Per quanto riguarda la terapia pre-emptiva, la Società Internazionale di Nefrologia raccomanda il ganciclovir per via ev (5mg/kg x2/die) per 15 giorni , seguito dal valganciclovir 900mg/die sino alla scomparsa della viremia.

Recentemente uno studio pilota ha valutato l'utilizzo del valganciclovir nel trattamento pre-emptivo dell'infezione da CMV (7) ed ha concluso che la potenza antivirale del farmaco sembra essere adeguata e che gli effetti collaterali sono comparabili al ganciclovir per via endovenosa. Inoltre la somministrazione per via orale è più conveniente per il paziente perché gli evita la somministrazione endovenosa ed inoltre si realizza una sensibile riduzione dei costi di ospedalizzazione.

4. **Foscarnet e Cidofovir**

Vengono utilizzati in caso di resistenza al ganciclovir o in presenza di mancata risposta ed intolleranza. È da ricordare che sono farmaci altamente nefrotossici, soprattutto in associazione con gli inibitori della calcineurina.

In caso di insuccesso con queste terapie, deve essere valutato l'utilizzo delle globulina iperimmuni, in associazione a tali farmaci, soprattutto nei casi di malattia grave che comporti il rischio di morte per il paziente.

Cytomegalovirus e trapianto di rene

Nel primo anno dopo il trapianto circa il 60% dei pazienti può andare incontro alle seguenti manifestazioni da infezione da citomegalovirus:

- 1) infezione primaria**
- 2) riattivazione virale (infezione secondaria)**
- 3) reinfezione (superinfezione)**

1) L'infezione primaria si realizza quando il donatore è sieropositivo per il CMV ed il ricevente è sieronegativo per il CMV. In questi casi il donatore presenta il virus in uno stato di latenza nelle proprie cellule e trasmette il virus al ricevente, sieronegativo per il CMV, attraverso l'organo trapiantato. Identica modalità di trasmissione del virus può verificarsi con la trasfusione di emoderivati in particolare di leucociti infetti (per tale motivo gli

emoderivati prima di essere trasfusi ad un candidato al trapianto dovrebbero essere filtrati).

Circa il 50% dei riceventi sieronegativi per il CMV, che ricevono il rene da un donatore sieropositivo per il CMV, sviluppano una malattia sintomatica da CMV.

2) La riattivazione virale (infezione secondaria) si determina quando il CMV presente nel ricevente, ma in condizioni di quiescenza, si riattiva. Ciò accade quando il ricevente è sieropositivo per il CMV ed il virus da uno stato di latenza nelle cellule incomincia a moltiplicarsi intensivamente.

Circa il 20% dei riceventi sieropositivi per il CMV sviluppa una malattia sintomatica, indipendentemente dallo stato sierologico per il CMV del donatore.

3) La reinfezione (superinfezione) si realizza quando il ricevente sieropositivo per il CMV riceve l'organo da un donatore sieropositivo per il CMV. In questo caso è il virus del donatore (ceppo virale differente) che si riattiva (8).

Circa il 50% dei riceventi sieropositivi per il CMV che hanno ricevuto l'organo da un donatore sieropositivo per il CMV, sviluppa una malattia sintomatica da CMV.

L'insorgenza di infezione da CMV nel paziente con trapianto di rene può determinare alcuni eventi negativi nelle fasi precoci del trapianto che possono essere distinti in :

A. Effetti diretti

B. Effetti indiretti

A) Gli effetti diretti della replicazione virale sono l'insorgenza di febbre, leucopenia, piastrinopenia con o senza segni di danno d'organo.

B) Gli effetti indiretti sono conseguenti all'azione del virus sul sistema immunitario dell'ospite. Essi comprendono il rigetto acuto dell'organo trapiantato, la nefropatia cronica del graft (9,10), l'aumentato rischio di infezioni opportunistiche (11). Infine sia l'infezione CMV asintomatica che la malattia CMV sono fattori di rischio indipendenti per l'insorgenza precoce del diabete mellito che può insorgere *de novo* nel post-trapianto (12,13).

L'importanza degli effetti indiretti risulta evidente se si considera che l'infezione da Citomegalovirus rimane una delle principali cause di morbidità e mortalità dopo il trapianto di rene,

arrivando ad un'incidenza di circa il 60% nei pazienti portatori di trapianto di rene (14,15).

L'infezione o malattia da CMV sono fattori di rischio indipendenti per gli episodi di rigetto acuto. E' difficile stabilire se è la malattia da CMV che predispone al rigetto o è il rigetto che predispone alla malattia da CMV. I dati della letteratura non sono di aiuto in tal senso. Pare che il CMV causi il rigetto attraverso la produzione di una varietà di citochine proinfiammatorie che, promuovendo la trascrizione dei geni che codificano per le molecole del MHC II, favoriscano l'esposizione degli antigeni endoteliali MHC II nel rene trapiantato. Mentre l'infiammazione dovuta al rigetto ed alcune terapie antirigetto aumentano la replicazione virale.

E' probabile che la riduzione della terapia immunosoppressiva, a seguito di una malattia da CMV sintomatica, possa innescare la catena di eventi che si conclude con il rigetto acuto.

È stato inoltre descritto da alcuni studi che l'infezione da citomegalovirus contribuisce alla disfunzione del graft determinando un netto rialzo dei livelli di creatinina sierica che subisce un miglioramento dopo terapia con ganciclovir, senza trattamento antirigetto.

È descritto che il trattamento pre-emptive con ganciclovir (in assenza di specifica terapia antirigetto) migliora la funzione renale nei riceventi di trapianto con infezione asintomatica da citomegalovirus e quadro biotico di rigetto acuto (16).

L'infezione da citomegalovirus predispone inoltre ad infezioni opportunistiche tra le quali vanno ricordate le infezioni da *Pneumocystis Carinii*, da funghi, da *Listeria Monocytogenes*.

Tutto ciò accade attraverso una riduzione di cellule CD4? ed un incremento di cellule CD8? (17).

L'infezione citomegalica nel paziente trapiantato aumenta il rischio di diabete mellito, inibendo il rilascio di insulina dalle cellule pancreatiche. Il meccanismo patogenetico sarebbe l'induzione di citochine proinfiammatorie da parte del virus che determinano apoptosi alterando la funzionalità delle cellule ? (18,19).

Altri meccanismi potrebbero essere l'infezione virale delle cellule pancreatiche con successiva apoptosi o un effetto citotossico con distruzione delle cellule pancreatiche infette da parte di linfociti citotossici o cellule natural killer.

Considerando sia l'elevata incidenza della infezione da CMV che i suoi enormi effetti dannosi sull'outcome clinico del graft, molti centri prescrivono una profilassi farmacologia antivirale, somministrando farmaci specifici a tutti i pazienti considerati ad alto rischio nei primi 90-120 giorni del post-trapianto, indipendentemente dalla presenza di viremia. Questa strategia terapeutica sembra ridurre il numero delle infezioni da CMV, o quanto meno di ritardarne la comparsa di appunto 3-6 mesi, quando il trapianto è più stabile ed il livello di immunosoppressione è più basso.

Attualmente non vi è accordo uniforme se la profilassi dia risultati clinici migliori rispetto alla terapia pre-emptive in base alla quale, invece, il paziente non riceve alcuna profilassi, ma viene monitorato in modo intensivo per quanto riguarda la replicazione

virale ed il trattamento specifico viene instaurato al primo aumento del CMV-DNA nel sangue (20).

Nel Centro Trapianti dell'Università di Napoli viene attualmente perseguita la politica del trattamento pre-emptive dell'infezione da CMV con utilizzo come prima scelta del valganciclovir al dosaggio di 900mg x 2/die per os per 21 giorni (opportunamente adattato ai livelli di funzionalità renale), seguito da 900 mg/die per os per ulteriori 15 giorni.

Per quanto riguarda il trattamento della malattia da CMV che richiede ospedalizzazione, viene invece utilizzato il ganciclovir al dosaggio di 5mg/kg x 2 volte/die e.v., anch'esso adattato ai livelli di funzionalità renale, per 21 giorni seguito da ganciclovir a dosaggio dimezzato per 15 giorni. Il trattamento può essere prolungato a seconda della gravità della malattia.

I dati che vengono presentati descrivono l'esperienza del Centro Trapianti dell'Università Federico II di Napoli su 160 pazienti trapiantati di rene, in cui l'infezione da CMV veniva trattata in modo pre-emptive con ganciclovir o valganciclovir e gli effetti della suddetta terapia sull'insorgenza di Diabete Mellito e di Rigetto Acuto.

PAZIENTI E METODI

Centosessanta pazienti (120M/40F) sottoposti a trapianto di rene presso il Centro Trapianti dell'Università di Napoli sono stati seguiti prospetticamente in follow-up periodico nei primi 6 mesi di trapianto. Tutti i pazienti avevano ricevuto un rene da donatore cadavere (con l'eccezione di tre) ed erano di razza caucasica (con l'eccezione di due); nessuno di questi pazienti era sottoposto a profilassi per l'infezione da CMV, indipendentemente dalla sierologia D/R anti-CMV.

In tutti i pazienti erano rilevati i dati demografici, la creatininemia alla fine del I e del VI mese di trapianto e l'insorgenza di infezione e/o malattia (sintomi clinici associati a danno d'organo)

da CMV, l'insorgenza di diabete (diagnosticato secondo i criteri ADA), la comparsa di rigetto acuto, diagnosticato sulla base del sospetto clinico-laboratoristico e confermato dalla biopsia.

Lo schema terapeutico immunosoppressivo includeva per tutti i pazienti una terapia d'induzione con metilprednisolone: 500 mg e.v. associato a basiliximab (anticorpo monoclonale anti-CD 25) 20 mg e.v. somministrati al momento del trapianto. Il basiliximab veniva ripetuto al 4 giorno ed il metilprednisolone veniva somministrato a dosi scalari dal primo giorno dopo il trapianto (125 mg nel 1° giorno, 80 mg nel 2°giorno, 40 mg nel 3° e 4°giorno e poi 16 mg fino a tre mesi dal trapianto, quando lo steroide era progressivamente ridotto al dosaggio di mantenimento di 4 mg/die). Oltre lo steroide, l'immunosoppressione standard prevedeva nella terapia di mantenimento un inibitore della calcineurina(CNI), mantenendo i

trough levels (TL) dei farmaci in un range tra i 200 ed i 350 ng/ml per la Ciclosporina (CsA) e tra gli 8 ed i 15 ng/ml per il Tacrolimus (FK), in relazione ai mesi di trapianto. Farmaci antimetaboliti, come il micofenolato mofetile (MMF) o il micofenolato sodico (MPS) venivano introdotti in terapia solo nei pazienti con ritardata ripresa funzionale (DGF) o in caso di rigetto.

Il follow-up dei pazienti selezionati avveniva bisettimanalmente nel primo mese poi una volta alla settimana ed infine ogni 20 giorni a partire dal terzo mese.

La diagnosi di infezione da citomegalovirus veniva fatta mediante la misura quantitativa della carica virale del CMV nel sangue periferico con la tecnica della PCR quantitativa. I nostri pazienti erano sottoposti al monitoraggio settimanale del CMV-DNA (e quindicinale dal 4° mese).

Il trattamento pre-emptivo veniva iniziato quando il numero di copie di DNA-CMV era superiore al nostro cut-off (600 copie/ml) e consisteva nella somministrazione di ganciclovir alla dose di 5mg/kg x 2 volte/die e.v. per 21 giorni o valganciclovir (900 mg x 2/die per os per 21 giorni) seguiti da ulteriori 15 giorni in cui la terapia era dimezzata. Il dosaggio dei suddetti farmaci veniva naturalmente adattato alla clearance della creatinina del paziente.

RISULTATI

I dati demografici dei pazienti osservati sono riportati nella Tabella 1.

Due pazienti erano al secondo trapianto, ed in 42 pazienti nel corso del periodo di follow-up fu necessario introdurre in terapia un farmaco antimetabolita.

Nella nostra popolazione la prevalenza di donatori e riceventi sierologicamente positivi al CMV era particolarmente elevata, essendo pari al 83.7% dei donatori ed al 67.4% dei riceventi; le singole associazioni tra i vari sierotipi sono descritte in Figura 1.

Un'infezione da CMV si riscontrava in 51/160 pazienti (35.2%), ma di essi solo 5 (3.1%) sviluppavano la malattia con coinvolgimento

di organi e necessità di ospedalizzazione. L'infezione era presente in prevalenza nei sierotipi D?R? (44.2%) e D?R? (38.8%), mentre la malattia era prevalente in questo ultimo sierotipo (3/5).

L'incidenza globale di DM del post-trapianto era del 23.7%, ed era equamente distribuita nei diversi sierotipi.

L'analisi della prevalenza di infezioni e diabete dei singoli sierotipi è riportata nella Figura 2. e Figura 3.

Nel campione in oggetto, la prevalenza di episodi di rigetto acuto era estremamente bassa (4%) e risultava similmente distribuita nei diversi gruppi. La funzione renale del nostro campione, espressa dalla creatininemia, mostrava un significativo miglioramento (78%, $p < 0.001$) nel corso di questi primi sei mesi; l'andamento era simile tra i diversi sierotipi e indipendentemente dall'incidenza delle

infezioni da CMV, dall'insorgenza di diabete mellito post-trapianto e
dalla comparsa di rigetti (Figura 4).

Discussione

Il trattamento “pre-emptive”, in associazione al livello moderatamente ridotto di immunosoppressione dei pazienti in osservazione, era in grado di determinare una prevalenza relativamente bassa sia di infezioni da CMV che, soprattutto, di malattia da CMV. Questo dato, peraltro, era associato ad un numero davvero esiguo di episodi di rigetto, nonostante la stragrande maggioranza dei pazienti fosse mantenuta in duplice terapia (più il basiliximab). Ciò sembra suggerire, seppure in modo indiretto, il ruolo causale del CMV nella patogenesi di molti episodi di rigetto descritti in ampie casistiche di pazienti mantenuti a livelli di immunosoppressione certamente più elevati di quelli dei pazienti in

osservazione nello studio attuale e caratterizzate da una maggiore prevalenza di infezione/malattia da CMV, ponendo ancora una volta l'interrogativo circa livelli di immunosoppressione più adatti nelle prime fasi del trapianto.

Infine, l'infezione/malattia da CMV non sembrava influenzare l'insorgenza di diabete mellito post-trapianto dal momento che era presente in tutti i sierotipi analizzati, senza alcuna differenza significativa tra i diversi gruppi.

L'infezione da Cytomegalovirus (CMV) è stata e continua ad essere una grave malattia infettiva che complica in modo significativo l'outcome dei trapianti di organi solidi (21).

Per questo motivo nel corso degli anni sono state sviluppate diverse modalità e diversi farmaci per prevenirla e trattarla in modo conveniente.

Anche se l'acyclovir e il valacyclovir si sono mostrati in qualche modo efficaci nella profilassi della malattia, la maggior parte dei centri si affida a varie formulazioni di ganciclovir.

Winston et al. sono stati i primi a dimostrare che il ganciclovir, somministrato per via endovenosa, previene efficacemente la malattia da CMV dopo trapianto di fegato (5).

La scarsa biodisponibilità del ganciclovir per os, preclude la possibilità di un trattamento efficace con questa modalità di somministrazione.

Oggi l'utilizzo del valganciclovir ha permesso di superare questa difficoltà, grazie all'elevata biodisponibilità di questo derivato valinico del ganciclovir: l'efficacia nella prevenzione (e nel trattamento) dell'infezione da CMV dopo trattamento per via orale è stata ormai ampiamente dimostrata (22).

Nonostante oggi si disponga di due farmaci altamente efficaci contro il CMV, non vi è ancora parere uniforme nella comunità scientifica e clinica circa il modo migliore di utilizzare questi farmaci.

I maggiori settori di dibattito comprendono la dose appropriata, la durata della somministrazione, ma soprattutto se contro il CMV debba essere instaurata una profilassi od una terapia pre-emptive.

Una recente “Consensus Conference”, riportata da Dmitrienko et al., mette in guardia su due aspetti importanti, che sia il ganciclovir che il valganciclovir sono farmaci costosi ed il loro uso di routine, e quindi in particolare nella profilassi prolungata, può essere associato a tossicità e selezione di ceppi resistenti di CMV (23).

Sia la profilassi che la terapia pre-emptive sono utilizzate per prevenire lo sviluppo della malattia da CMV dopo trapianto.

Per stabilire il migliore approccio terapeutico sarebbe utile effettuare uno studio prospettico randomizzato e controllato di adeguata numerosità, a tutt'oggi ancora non effettuato (23).

Infatti, i risultati dello studio di Khoury et al. (prospettico e randomizzato) non sono risolutivi essendo stato condotto su un campione relativamente piccolo di pazienti, alquanto disomogeneo da un punto di vista immunologico, poiché includeva sia trapianti ad alto che a basso rischio (24).

Le conclusioni dello studio mettevano in risalto che sia la profilassi che l'approccio pre-emptive con valganciclovir erano parimenti efficaci nella gestione dell'infezione da CMV. La profilassi si dimostrava ovviamente più efficace nel ridurre l'incidenza di infezione da CMV, ma forse era meno risolutiva nel prevenire la malattia sintomatica nei pazienti ad alto rischio del sierotipo D+/R-.

Secondo gli Autori, i costi dei due diversi approcci terapeutici erano uguali (24).

La terapia pre-emptive espone un minor numero di pazienti a farmaci tossici e costosi, ma è più laboriosa e richiede un monitoraggio più intensivo. La profilassi è meno complicata e richiede un monitoraggio certamente meno intensivo e quindi meno costoso. Probabilmente, un approccio selettivo di profilassi per i pazienti ad alto rischio ed un trattamento pre-emptive per i pazienti con più basso rischio, dovrebbe risultare meno costoso della profilassi universale, come suggerito da Dmitrienko et al. (23).

Nel decidere la migliore strategia terapeutica tra la profilassi e il trattamento pre-emptive bisogna tener conto anche degli effetti indiretti causati dal CMV.

Infatti l'aumento di rigetto acuto e cronico, la perdita del graft, le infezioni opportunistiche, l'aumento di mortalità e, più di recente, l'aumento di diabete mellito nel post-trapianto, sono stati associati con la comparsa anche di infezione, anche asintomatica, da CMV. Infatti, oltre il già citato studio di Khoury et al. (24), Sagedal et al. hanno riportato che l'antigenemia asintomatica da CMV riduce la sopravvivenza del graft e aumenta in generale la mortalità (25), in uno studio prospettico in cui i pazienti erano trattati in modo pre-emptive.

Un recente studio di metanalisi effettuato da Kalil et al. suggerisce che, anche se la terapia pre-emptive è simile alla profilassi nel prevenire la malattia, solo la profilassi ha determinato una maggior sopravvivenza dei pazienti (26). Questo sembrerebbe suggerire che la profilassi ha il vantaggio nell'evitare gli effetti secondari del CMV, a parità di costi.

Anche se lo studio osservazionale fin qui descritto ha un follow-up troppo breve per potere permettere di trarre risultati definitivi, i dati preliminari sembrano suggerire che il trattamento pre-emptive non condiziona la comparsa di un elevato numero di episodi di malattia da CMV, né di diabete (i cui casi sono equamente distribuiti nei vari gruppi sierologici). Inoltre, il numero di rigetti del campione in oggetto è risultato bassissimo, a dispetto di un regime terapeutico di immunosoppressione certamente poco sostenuta.

Anche se un certo numero di rigetti soprattutto sub-clinici può essere sfuggito all'osservazione clinica, poiché nel Centro Trapianti di Napoli non vengono effettuate biopsie renali "da protocollo", l'andamento uniforme degli indici di funzionalità renale permette di ipotizzare che la prevalenza di rigetti è davvero bassa.

Questa strategia terapeutica non solo protegge dal rischio del CMV (e del possibile aumento dei rigetti ad esso collegati), ma anche di altri eventi avversi legati ad una maggiore immunosoppressione, come ad esempio lo sviluppo di malattia da polioma-virus, che ha le stesse conseguenze nefaste sull'outcome del graft.

Infine, un cenno alle possibili differenze in campo di farmaco-economia. Il costo stimato della sorveglianza microbiologica nel trattamento pre-emptive, pari a circa €700 per 20 determinazioni della viremia e €4000 per eventuale terapia (totale €4700), risulta certamente più basso di quello di una eventuale profilassi di 90 giorni (pari a circa €6500). Nella casistica in oggetto, caratterizzata da un bassissimo numero di episodi malattia da CMV e, quindi, da rarissima necessità di ospedalizzazione, questa differenza economica potrebbe divenire consistente se moltiplicata per grossi numeri di pazienti.

Profilassi sistematica o terapia pre-emptive?

Come già detto, attualmente non vi è uniformità di pensiero su quale scelta sia migliore e i dati della letteratura non sono dirimenti in tal senso, anche se il dibattito sull'efficacia dei diversi schemi profilattici per la prevenzione dell'infezione da CMV resta vivace.

Sulla base di una valutazione complessiva dei dati, la Società Internazionale di Nefrologia raccomanda nel trapianto di rene la profilassi con farmaci antivirali solo nei pazienti ad alto rischio cioè nei riceventi CMV negativi quando ricevono il rene da donatori CMV positivi e nei riceventi CMV positivi quando si faccia uso di terapia immunosoppressiva con globulina anti-linfociti (ALG), con globulina anti-timociti (ATG) ed altri sieri anticorpali (OKT3); mentre la terapia pre-emptive viene utilizzata per tutti gli altri pazienti monitorando la carica virale con tecniche laboratoristiche (27).

I dati di uno studio prospettico condotto da Dmitrienko et al. su un campione di 270 pazienti riceventi trapianto di rene, effettuato seguendo le citate linee guida e quindi integrando le due strategie terapeutiche, hanno evidenziato che, entro i primi sei mesi di trapianto, un'infezione da CMV si riscontrava nel 27% dei pazienti mentre il 9% di essi sviluppava la malattia (27). Invece, nella nostra popolazione di 160 pazienti, in trattamento "pre-emptive", un'infezione da CMV si riscontrava nel 35.2% dei pazienti, e solo il 3.1% di essi sviluppava la malattia. Con il trattamento pre-emptive nella nostra casistica si osservava una più alta incidenza di infezioni da CMV e una ridotta incidenza di episodi di malattia. I due studi però hanno utilizzato metodiche diverse per la diagnosi di infezione da citomegalovirus: l'antigenemia specifica nello studio di Dmitrienko e

la misura quantitativa della carica virale del CMV con la tecnica della PCR nel nostro studio.

Studi randomizzati comparativi sono necessari per confrontare queste due strategie terapeutiche e per valutare la possibile influenza di entrambe sulla sopravvivenza del graft e sulla mortalità globale del paziente.

BIBLIOGRAFIA

1. 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;355:2032-36.
2. Humar A, Kumar D, Boivin G, Caliendo AM: Cytomegalovirus (CMV) virus load kinetics to predict recurrent disease in solid organ transplant patients with CMV disease. *J Infect Dis* 2002;186:829-833.
3. American Journal of Transplantation 2004;4(Suppl.10):51-58 Blackwell Munksgaard "Cytomegalovirus".
4. Paya CV, Razonable RR. Cytomegalovirus infection after organ transplantation. In: Bowden RA, Ljungman P, Paya CV.

eds. *Transplant Infections*, 2nd edn. Lippincott, Williams and Wilkins 2003:298-325

5. Winston DJ, Wirin D, Shaked A, Busuttil RW. Randomised comparison of ganciclovir and high-dose acyclovir for long term cytomegalovirus prophylaxis in liver-transplant recipients. *Lancet* 1995;346 (8967): 69-74.

6. Wiltshire H, Paya CV, Pescovitz MD et al. Pharmacokinetics of oral ganciclovir and valganciclovir in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2005;79:1447.

7. Lopau K, Greser A, Wanner C. Efficacy and safety of preemptive antiCMV therapy with valganciclovir after kidney transplantation. *Clin Transplant* 2007;21:80-85. Blackwell Munksgaard, 2006.

8. Rubin R. Infection in the organ transplant recipient. In: *Clinical Approach to Infection in the Compromised*

Host. Edited by RH Rubin and LS Young. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002; 573-9.

9. Nett PC, Heisey DM, Fernandez LA, Sollinger HW, Pirsh JD. Association of cytomegalovirus disease and acute rejection with graft loss in kidney transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 1036.

10. Solez K, Vincenti F, Filo RS. Histopathologic findings from 2-year protocol biopsies from a US multicenter kidney transplant trial comparing tacrolimus versus cyclosporine: a report of the FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation* 1998; 68: 1736

11. George MJ, Snyderman DR, Werner BG, et al. The independent role of cytomegalovirus as a risk factor for invasive fungal disease in orthotopic liver transplant recipients. *Am J Med* 1997; 103: 106-13.

12. Hjelmesaeth J, Sagedal S, Hartmann A. et al. Asymptomatic cytomegalovirus infection is associated with increased risk for new-onset diabetes mellitus and impaired insulin release after renal transplantation. *Diabetologia* 2004;47:1550-56.

13. Hjelmesaeth J, Sagedal S, Hartmann et al. Cytomegalovirus infection is associated with increased risk for new-onset diabetes and impaired insulin release after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2003;14 (abstract):PO 487.

14. Sagedal S, Hartmann A, Nordal KP et al. Impact of early cytomegalovirus infection and disease on long-term recipient and kidney graft survival. *Kidney Int* 2004;66:329-337.

15. Kashyap R, Shapiro R, Jordan M, Randhawa PS. The clinical significance of cytomegaloviral inclusions in the allograft kidney. *Transplantation* 1999;67:98-103

16. Reinke P, Fietze E, Ode-Hakim S et al. Late-acute renal allograft rejection and symptomless cytomegalovirus infection. *Lancet* 1994;344:1737-1738
17. Rubin RH. Impact of Cytomegalovirus infection on organ transplant recipients. *Rev Infect Dis* 1990.12:754-766.
18. Hjelmestaeth J, Muller F, Jenssen T, Rollag H, Sagedal S et al. Is there a link between cytomegalovirus infection and new-onset posttransplantation diabetes mellitus? Potential mechanisms of virus induced β -cell damage. *Nephrol Dial Transplant* (2005) 20;2311-2315.
19. Greenberg AS, McDaniel ML. Identifying the links between obesity, insulin resistance and β -cell function: potential role of adipocyte derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest* 2002.
20. Puius YA, Snyderman DR. Prophylaxis and treatment of cytomegalovirus disease in recipients of solid organ transplants:

current approach and future challenges. *Curr Opin Infect Dis.*2007 Aug;20(4):419-24

21. MD Pescovitz A cost too high to bear? Prophylaxis versus preemptive therapy to prevent post-transplantation cytomegalovirus; *Kidney International* (2007) 72, 912-913

22. Paya C, Humar A, Dominguez E et al. Efficacy and safety of valganciclovir vs oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2004; 4: 611-620

23. Dmitrienko S, Yu A, Balshaw R, et al. Prediction, prognosis, and treatment costs for CMV infection in renal transplantation with consensus management guidelines. *Kidney International* 2007; 72: 1014-1022

24. Khoury JA, Storch GA, Bohl DL et al. Prophylactic versus preemptive oral valganciclovir for the management of

cytomegalovirus infection in adult renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2006; 6: 2134-2143

25. Sagedal S, Nordal KP, Hartmann A et al. The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *Am J Transplant* 2002; 2: 850-856

26. Kalil A, Levitsky J, Lyden E et al. Meta-analysis: the efficacy of strategies to prevent organ disease by cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Ann Int Med* 2005; 143: 870-880.

27. Dmitrienko S, Shapiro RJ and Keown PA. "The use of consensus guidelines for management of cytomegalovirus infection in renal transplantation. *KI* 2007; 72: 1014-1022. International Society of Nephrology.

Tab. 1. Dati demografici e terapia

N.PAZIENTI		160
ETÀ	46,1±1,1	
M/F	120/40	
STER	160	(100 %)
CsA	106	(66 %)
FK	53	(33 %)
SRL	2	(1 %)
MMF	42	(26 %)
EC-MPS	6	(4 %)

Fig. 1. Sierotipi della popolazione in studio

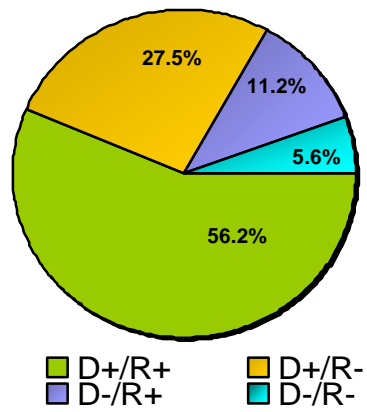


Fig. 2. Prevalenza di Infezioni

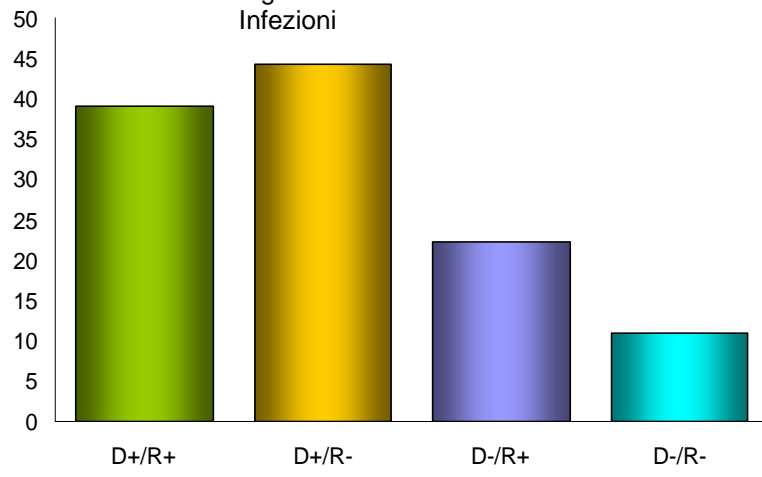


Fig. 3. Prevalenza di Diabete

