



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

**DIPARTIMENTO DI ISTOLOGIA, MICROBIOLOGIA E
BIOTECNOLOGIE MEDICHE**

**DOTTORATO DI RICERCA IN VIROLOGIA
E BIOTECNOLOGIE MICROBICHE**

XXI CICLO

**STUDIO DEI CORRELATI
VIROLOGICI, PATOLOGICI E CLINICI
IN PAZIENTI PEDIATRICI TRAPIANTATI
DI RENE: APPLICAZIONE DI NUOVE
INDAGINI MOLECOLARI**

Coordinatore: Ch.mo Prof. Giorgio Palù

Supervisore: Prof. Luisa Barzon

Dottorando: Dr.ssa Monia Pacenti

2 febbraio 2009

INDICE

RIASSUNTO	pag.. 4
ABSTRACT	pag . 7

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE	pag. 9
---------------------------	--------

1.1. Trapianto di rene nel paziente pediatrico	9
1.1.1. Aspetti del trapianto di rene nel bambino	9
1.1.2. Trapianto di rene nel paziente pediatrico in Italia.....	10
1.1.3. Regimi immunosoppressivi nel paziente pediatrico trapiantato di rene.	11
1.2. Rischio di infezione virale nel paziente trapiantato di rene.	12
1.2.1. Epidemiologia delle infezioni nel paziente trapiantato	13
1.2.2. Infezione virale primaria o riattivazione.	14
1.2.3. Time course dell'infezione virale nel paziente trapiantato di rene.	15
1.3. Comuni infezioni virali nel paziente trapiantato di rene.	16
1.3.1. Virus erpetici e infezioni renali post trapianto	16
1.3.1.1. Infezioni da HCMV	16
1.3.1.2. Infezioni da EBV	18
1.3.1.3. Infezioni da HHV6 e HHV7.....	19
1.3.1.4. Infezioni da HHV8.....	19
1.3.1.5. Infezioni da VZV.	20
1.3.2. Poliomavirus e lesioni del rene trapiantato.	20
1.3.2.1. Nefropatie associate a BKV (PVAN) nel paziente trapiantato di rene..	23
1.3.3. Il Parvovirus B19 nel paziente trapiantato di rene.	23
1.3.3.1. Patogenesi dell'infezione da parvovirus B19 e relativa risposta immunitaria. .	24
1.3.3.2. Trasmissione dell'infezione da parvovirus B19.....	25
1.3.3.3. Manifestazioni cliniche dell'infezione da parvovirus B19.	25
1.3.3.4. Diagnosi e metodi di indagine dell'infezione da parvovirus B19.....	26
1.3.3.5. Terapia delle infezioni da parvovirus B19.	27

SCOPO DELLO STUDIO	29
---------------------------------	----

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI	31
---------------------------------	----

2.1. PAZIENTI.....	31
2.1.1. Casistica dei pazienti in esame.....	31
2.1.2. Regime immunosoppressivo.	31
2.2. MATERIALI.....	32
2.2.1. Biopsie.....	32
2.2.2. Campioni di Sangue	33
2.2.3. Campioni dell' "unità rene" del donatore	33
2.3. METODI	35
2.3.1. Determinazione delle sequenze genomiche virali mediante Real time PCR quantitativa	35

2.3.1.1. Estrazione del DNA dai campioni biologici	35
A. Purificazione del DNA dalle biopsie paraffinate e congelate.	35
B. Purificazione del DNA da sangue.	36
C. Purificazione di DNA dalle frazioni cellulari delle soluzioni di conservazione e di lavaggio del rene del donatore.....	36
2.3.1.2. Real time PCR quantitativa per la ricerca del DNA virale	36
2.3.1.3. Ricerca delle sequenze genomiche dei nuovi poliomavirus.....	44
A. Ricerca delle sequenze genomiche del WU virus (WUV):.....	44
B. Ricerca delle sequenze genomiche del KI virus (KIV):	46
2.3.2. Tipizzazione virale dei campioni positivi per il parvovirus B19.	46
2.3.2.1. Protocollo di sequenziamento automatico.....	46
2.3.3. Valutazione dei trascritti virali di B19 nelle biopsie di rene.....	47
A. Estrazione di RNA totale.....	47
B. Retrotrascrizione dell'RNA totale.....	47
C. RT- PCR Real time.	48
2.3.4. Analisi dello stato sierologico del donatore e del ricevente (D/R).	48
2.3.5. Valutazione clinica della funzionalità renale.	48
2.3.6. Analisi statistica dei dati.	50
CAPITOLO 3	
RISULTATI	51
3.1. Ricerca delle sequenze virali nelle biopsie del rene del donatore.....	51
3.2. Identificazione di sequenze virali intrarenali, rischio di rigetto renale acuto o cronico e funzione renale durante il follow-up	52
3.3. Persistenza del DNA virale nelle biopsie di follow-up e rischio di sviluppare lesioni nel rene trapiantato.	56
3.4. Ruolo del parvovirus B19 nell'infezione renale post trapianto: infezione persistente o litica?	59
3.5. Identificazione delle sequenze virali intra-renali ed infezioni virali sistemiche.....	61
3.6. Approfondimento dell'indagine virologica del rene del donatore.	64
3.6.1. Identificazione del DNA virale nell'unità rene	65
3.6.2. Confronto tra la sierologia del donatore e del ricevente e la presenza del DNA virale nell'unità rene.	66
3.6.3. Associazione tra l'identificazione del DNA virale nell'unità rene e rischio di infezione nel ricevente.	67
3.6.4. Valutazione della comparsa di DNAemia in corso di follow-up.	70
3.7. Ricerca del DNA dei nuovi poliomavirus, KIV e WUV, nell'unità rene.	71
CAPITOLO 4	
DISCUSSIONE	72
CAPITOLO 5	
CONCLUSIONI	78
Bibliografia essenziale	79

RIASSUNTO

Il ruolo dell'infezione virale nell'insorgenza di lesioni nel rene trapiantato non è stato ancora del tutto precisato sebbene alcuni virus come HCMV, EBV, VZV, HHV6, HHV8, in una fase più precoce, e il poliomavirus BK (BKV) e JC (JCV) e al parvovirus B19, dopo più tempo dal trapianto, sembrano avere una precisa funzione nel determinare danni a carico del rene trapiantato. Infatti, tutti questi virus sono stati già descritti come importanti patogeni con tropismo renale.

Nel presente studio sono state investigate le infezioni virali, intrarenali e sistemiche, in una casistica di bambini e giovani adulti che sono stati sottoposti a trapianto di rene dal 2000 al 2006. Più esattamente sono stati analizzati i dati della prevalenza delle sequenze genomiche virali intrarenali e delle infezioni sistemiche (DNAemia) in associazione con il rischio di insorgenza di rigetto acuto e/o di lesioni croniche del rene trapiantato.

La presenza delle sequenze genomiche virali dei virus erpetici umani, dei poliomavirus e del parvovirus B19 è stata analizzata a livello della biopsie di rene eseguite al momento del trapianto, biopsie *baseline*, in presenza di disfunzioni renali acute e durante i primi due anni dal trapianto seguendo i tempi del protocollo di follow-up cioè a 6, 12 e 24 mesi post trapianto.

Sono stati studiati 69 riceventi pediatrici, bambini e giovani adulti, con un'età media pari a 13 anni che avevano ricevuto il rene da donatore deceduto in 65 casi e in 4 casi da familiare vivente: l'età dei donatori era inferiore a 6 anni in 15 casi.

I risultati di questa prima parte dello studio, relativi alla prevalenza del DNA virale intrarenale sono stati correlati con i dati clinici, i dati di viremia (DNAemia), di funzionalità del rene trapiantato e con le valutazioni istologiche dello stesso momento del follow-up.

Globalmente, il DNA virale è stato ritrovato nel 46% delle biopsie *baseline* e nel 70% delle biopsie di follow-up, dove generalmente persiste nelle biopsie successive. I virus più frequentemente identificati sono il parvovirus B19 e l'herpesvirus HHV6, già presenti a livello delle biopsie di rene del donatore. Mentre la presenza delle sequenze genomiche dei virus EBV e BKV è stata associata alla comparsa di lesioni acute nel rene trapiantato. Tra tutti i virus studiati e ritrovati a livello del rene del ricevente, soltanto il DNA del parvovirus B19 e la relativa DNAemia sono state associate con lo sviluppo di lesioni croniche del rene trapiantato: tale dato non era mai stato dimostrato in precedenti studi della letteratura. Per quanto riguarda il HCMV, la relativa DNAemia è stata considerata un fattore di rischio per la comparsa di episodi di rigetto acuto: dato, questo, già dimostrato e confermato con il nostro studio. Quindi è possibile concludere che il parvovirus B19 sembra preferire, in modo particolare, il rene come possibile

bersaglio da infettare e la sua persistenza intrarenale è associata con la comparsa di lesioni croniche del rene trapiantato.

Nella seconda parte del presente studio, con l'intento di identificare nuovi marcatori del rischio di infezione del ricevente trapiantato di rene, è stata valutata la presenza delle sequenze genomiche virali di EBV, HCMV, BKV, e del parvovirus B19 nel rene del donatore prima dell'impianto; più precisamente sono state analizzate le biopsie, le soluzioni di conservazione e di lavaggio dell'organo prima che questo venga trapiantato. È stato osservato poi se la presenza del DNA virale nell'unità rene (ovvero l'insieme dei diversi campioni derivati dal donatore: biopsia, soluzione di conservazione e di lavaggio) correlava con la comparsa dell'infezione virale nel ricevente. L'indagine condotta a livello dei diversi campioni dell'unità rene del donatore, consente di aumentare la sensibilità del test molecolare, ma anche da maggiori indicazioni relative al meccanismo di trasmissione dell'infezione virale mediante il rene trapiantato dal momento che i diversi campioni dell'unità rene sono arricchiti di più frazioni cellulari del donatore: sono presenti sia le cellule residenti del rene a livello della biopsia, ma anche le cellule del sangue circolante soprattutto nel liquido di lavaggio.

Le sequenze genomiche virali sono frequentemente identificate nell'unità rene del donatore, soprattutto nelle soluzioni di conservazione e di lavaggio. Globalmente, il DNA virale è stato identificato, in almeno un tipo di campione dell'unità rene, in 51 su 75 reni donati (68%) e il virus più ritrovato è il B19 (47%). In accordo con la loro capacità di definire uno stato di latenza dei linfociti B e nei monociti, il DNA dei virus EBV, nel primo caso, e HCMV nel secondo, sono stati identificati principalmente nelle soluzioni di lavaggio e di conservazione, poiché tali virus sono probabilmente veicolati dalle cellule del sangue periferico. Mentre, nel caso del parvovirus B19, il DNA virale è stato trovato spesso nelle biopsie del rene del donatore: questo suggerisce che il virus probabilmente infetta le cellule residenti del rene, le quali potrebbero essere un importante sorgente di trasmissione dell'infezione al ricevente. Il poliomavirus BK si pensa abbia un particolare tropismo per il rene e che vada in latenza nelle cellule epiteliali tubulari del rene: ciononostante nel presente studio il DNA di BKV è stato identificato solo in una biopsia di rene del donatore mentre è stato più volte ritrovato, anche in maniera persistente, nelle biopsie di follow-up. In generale, è stato possibile constatare che la presenza del DNA virale nel rene del ricevente è un importante fattore di rischio di infezione sistemica per il ricevente sieronegativo nel primo periodo successivo al trapianto. In particolare, la presenza del DNA di EBV nell'unità rene donata comporta un più elevato rischio di infezione da EBV nel ricevente sieronegativo, mentre la persistenza di B19 nel rene del ricevente è un fattore di rischio di infezione e/o di DNAemia da B19 per il ricevente sia sieropositivo che sieronegativo. Al contrario questo tipo di indagine molecolare dell'unità rene del donatore, condotta per il HCMV e per BKV non mostra una valida utilità diagnostica. Concludendo, con questo studio è stato possibile dimostrare che

l'identificazione di acidi nucleici virali a livello delle soluzioni di lavaggio e di conservazione del rene da trapiantare potrebbe essere un test molecolare particolarmente utile per riconoscere i riceventi con un maggior rischio di infezione, soprattutto sistemica. La sensibilità e la specificità di tale test molecolare dipende però dal tropismo del virus per le cellule o per il tessuto dell'organo da trapiantare.

ABSTRACT

The relevance of viral infections in allograft lesion development is still unclear, although some viruses such as HCMV, EBV, VZV, HHV6, HHV8, seem to have a particular role especially during the first months after transplantation, and the polyomavirus BK (BKV), JC (JCV) and the parvovirus B19, have been implicated in the occur of kidney injury after more time following transplant.

In this study we investigated systemic and intrarenal viral infections in kidney transplant young recipients and we analysed the association of these data with the risk of acute rejection and chronic allograft injuries predictive of long-term dysfunction.

The presence of DNA sequences of human herpesviruses, polyomaviruses, and parvovirus B19 was analysed in renal allograft biopsies performed at baseline, for acute renal dysfunction and for follow-up during the first two years post transplant. We evaluated the presence of viral sequences in 69 transplanted children and young adult who underwent kidney transplant from 2000 to 2006: donor age was less than 6 year in 15 cases. These results regarding the genomic viral presence in these patients were correlated with clinical data, viral DNAemia, renal function tests and allograft histology analysed at the same time points of the follow-up. Taken as a whole, viral DNA was detectable in 46% baseline biopsies and in 70% follow-up biopsies of kidney allografts, where it generally persisted. The most frequently detected viruses were B19 and HHV-6, already present in donor kidneys, and BKV and EBV, usually involving the allograft during follow-up. Among viruses, only the intrarenal persistence of B19 DNA and B19 DNAemia was associated with the development of chronic allograft injury: these kind of data were never demonstrated before in literature. Regarding HCMV DNAemia, it was considered a risk factor for acute rejection as already suggested in many works from the literature. So, we conclude that parvovirus B19 seems to electively target the kidney and its intrarenal persistence is associated with chronic kidney allograft injury.

In the second part of this work, in order to identify new markers for a rapidly identification of viral infections occur early after transplantation and are often transmitted from the graft, we investigated whether EBV, HCMV, BKV, and parvovirus B19 genome sequences could be detected in kidney grafts, preservation and washing solutions before implantation, and whether they correlated with the occurrence of viral infections in the recipient.

The investigation of different donor graft samples (i.e., biopsy, preservation and washing solutions) that we wholly named "*Kidney Unit*" (KU), increased the sensitivity of viral DNA testing, but also gave clues to the mechanism of viral transmission through the kidney graft while the different samples are enriched from different cells from the donor: resident kidney cells or

circulated blood cells. Viral genome sequences were frequently detected in donor renal graft units, especially in preservation and washing solutions. Overall, viral DNA was detected in at least one type of sample, including biopsy, preservation and washing solutions, in 51/75 (68%) kidney grafts and B19 was the most frequently detected virus (47%).

In agreement with their ability to establish latency in B lymphocytes and in monocytes progenitor cells, respectively, EBV and HCMV were probably carried by circulating blood cells, since viral DNA was generally detected in preservation and washing solutions, which are contaminated by blood cells, but not in kidney biopsies; whereas B19 DNA was often detected in kidney graft biopsies, besides in preservation and washing solutions, thus suggesting the virus probably infected resident kidney cells, which might be important sources of transmission to the recipient.

BKV is supposed to have tropism for the kidney and to achieve latency in renal tubular epithelial cells; however, we detected BKV DNA only in one donor kidney biopsy, whereas viral DNA was generally detectable in the allograft during follow-up, where it persisted, as we previously demonstrated.

The prevalence of EBV, HCMV, and BKV DNA was higher in preservation and washing solutions than in biopsies, indicating they were mainly carried by blood cells, whereas B19 was consistently detected in biopsies and solutions, suggesting virus was also present in resident kidney cells. Detection of viral DNA in kidney grafts was a significant risk factor for symptomatic infections in seronegative recipients in the early post-transplant period. In particular, EBV DNA-positive donor grafts were significantly associated with the risk of EBV infection in seronegative recipients, whereas the presence of B19 DNA in kidney grafts was a risk factor for B19 infection and/or DNAemia both in B19-seronegative and seropositive recipients. At variance, molecular testing for HCMV and BKV in donor graft had poor diagnostic utility.

In conclusion, this study demonstrates that detection of viral nucleic acids in preservation and washing solutions of a solid organ, i.e., the kidney, before implantation could be a useful test to identify recipients with increased risk of infections, especially symptomatic infections, in the early post-transplant period. The sensitivity and specificity of the test depends on viral tropism for cells and tissues of the graft.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1. Trapianto di rene nel paziente pediatrico

1.1.1. Aspetti del trapianto di rene nel bambino

Dal punto di vista clinico il trapianto di rene è l'unica possibilità per riabilitare totalmente un bambino con malattie renali croniche, in fase di insufficienza renale terminale. Rappresenta inoltre un'alternativa risolutiva al trattamento emodialitico, migliorando lo sviluppo psico-sociale e la crescita staturale-ponderale del bambino, in modo particolare quando il trapianto viene effettuato prima della pubertà. Per paziente pediatrico intendiamo il paziente che ha iniziato il trattamento dialitico prima dei 15 anni di età e con un'età inferiore a 18 anni. Occorre considerare il paziente pediatrico in maniera differente dal paziente adulto sia nella fase chirurgica del trapianto, sia al momento di stabilire un corretto follow-up. Infatti aspetti tecnici dell'intervento chirurgico, nonché aspetti immunologici, metabolici e psico-sociali distinguono il paziente pediatrico trapiantato di rene dal paziente adulto. Per quanto riguarda l'aspetto tecnico, occorre infatti avere maggiori attenzioni sia in fase intraoperatoria che immediatamente dopo l'intervento chirurgico soprattutto nel caso in cui sia stato impiegato un rene di dimensioni superiori e che rende più difficile la ripresa della funzionalità dell'organo con un aumentato rischio necrosi tubulare acuta e di perdita del rene trapiantato a causa di trombosi vascolare (Salvatierra O *et al.*, Transplant Proc 1999). Inoltre, anche per quanto riguarda il follow-up, l'adulto trapiantato di rene segue un percorso diverso da quello del bambino.

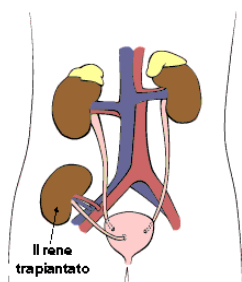


Figura 1. Rappresentazione del tipo di innesto che si esegue per procedere al trapianto di rene.

Una volta riuscito il trapianto renale occorre monitorare il bambino per eventuali complicazioni della funzionalità dell'organo trapiantato che potrebbero presupporre ad episodi di rigetto acuto e/o cronico determinando la perdita dell'organo e/o la morte del paziente. Per il paziente pediatrico trapiantato di rene è infatti necessario considerare aspetti peculiari quali:

- il sistema immunitario *naive* per numerose infezioni batteriche e, soprattutto, virali (Dharnidharka VR *et al.*, Transplantation 2006);
- una costitutiva induzione del sistema immunitario (Sozen H *et al.*, Transplantation Proceeding 2006);
- un diverso assorbimento e metabolismo di numerosi farmaci immunosoppressori che tendono anche a rallentare la crescita del paziente pediatrico.

I principali problemi del paziente pediatrico sono dovuti in particolar modo alla scarsa *compliance* nei confronti della terapia immunosoppressiva (Traum AZ *et al.*, Pediatrics. 2008). Infatti gli inconvenienti legati all'immunosoppressione rimangono a tutt'oggi la principale causa di morbilità dopo un trapianto renale pediatrico, sia per un' effetto tossico diretto sia per l'aumentato rischio di infezioni da parte di patogeni opportunistici. Sebbene numerosi report della letteratura mostrino che il trapianto di rene pediatrico abbia una minore riuscita rispetto al trapianto nell'adulto (Salvatierra O *et al.*, Transplant Proc 1999), non ci sono dimostrazioni dell'effetto del fattore età sulla sopravvivenza dell'organo trapiantato (Lufft V *et al.*, Nephrol Dial Transplant 2003). In realtà è riconosciuto un maggior rischio di insorgenza di rigetti acuti nel paziente pediatrico, giustificabili ancora una volta con la vigorosa induzione della risposta immunitaria tipica del bambino (Salvatierra O *et al.*, Transplant Proc 1999) e che si cerca di evitare con dei regimi immunosoppressivi specifici (Lufft V *et al.*, Nephrol Dial Transplant 2003).

1.1.2. Trapianto di rene nel paziente pediatrico in Italia

In Italia l'organizzazione dei trapianti si basa su di un Centro Nazionale che ha sede presso l'Istituto Superiore di Sanità e su tre Coordinamenti multiregionali: Nord Italia Transplant program (NITp), Associazione Interregionale Trapianti (AIRT), Organizzazione Centro-Sud Trapianti (OCST). Il NITp, nato nel 1972, è storicamente la prima organizzazione italiana e si basa sulle convenzioni tra diverse Regioni. Comprende un'area di circa 19 milioni di abitanti in Lombardia, Veneto, Trentino, Friuli-Venezia Giulia, Liguria e Marche. Inoltre, dal maggio 1997 è attivo il Programma Nazionale Pediatrico per il Trapianto di rene: tutti i pazienti pediatrici

vengono iscritti in un'unica lista nazionale. Le modalità per l'iscrizione in lista d'attesa nel NITp sono le stesse illustrate per l'iscrizione al trapianto per l'adulto. In Italia esistono tre centri di riferimento: a Genova (San Martino collegato all'Istituto Gaslini), a Milano (IRCCS Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena collegato alla Clinica De Marchi) e a Padova (Clinica Pediatrica – Policlinico). Va sottolineato che per il paziente pediatrico, come pure per quello adulto, un limite importante di questa *terapia sostitutiva* resta la disponibilità di organi per effettuare il trapianto di rene. Al fine di incrementare il numero dei trapianti, gli esperti del settore (chirurghi, nefrologi, microbiologi) hanno recentemente introdotto la possibilità di utilizzare alcune categorie di donatori (HBsAg positivi, HCV positivi, anti-HBc positivi) in riceventi affetti dalla stessa patologia o immunizzati contro di essa. Tale decisione è però accompagnata dalla richiesta di una più attenta indagine, sierologica e molecolare, dell'organo del donatore atta a minimizzare i possibili rischi di trasmissione di malattie neoplastiche e in particolare di infezioni opportunistiche (Fishman JA *et al.*, NEJM 2007).

1.1.3. Regimi immunosoppressivi nel paziente pediatrico trapiantato di rene.

Esiste, in campo pediatrico, una particolare attenzione nei confronti della terapia immunosoppressiva. Una buona immunosoppressione permette di ridurre l'incidenza dei rigetti acuti, e di conseguenza anche l'incidenza dei rigetti cronici, migliorando così la sopravvivenza dell'organo trapiantato (Traum AZ *et al.*, Pediatrics. 2008).

Esiste però una serie di effetti collaterali legati all'utilizzo di questi farmaci, che sono particolarmente dannosi nel paziente pediatrico come ad esempio la scarsa crescita e l'insorgenza di infezioni. Dunque, le complicanze legate all'immunosoppressione vengono identificate come la principale causa di morbilità dopo un trapianto renale pediatrico. Per quanto riguarda la crescita, si è visto che nei bambini che hanno subito un trapianto renale è indispensabile il recupero della normale funzionalità glomerulare e che la terapia con steroidi correla con la crescita in caso di terapie a lungo termine e ad elevati dosaggi (Sarwal MM *et al.*, Transplantation 2001).

In uno studio condotto dal NAPRCTS (North American Pediatric Renal Transplant) sui cambiamenti relativi ai protocolli di trapianto renale si è osservata una significativa modificazione delle scelte terapeutiche. Lo schema classico di duplice terapia, con ciclosporina e steroide, o triplice con azatioprina, trova a tutt'oggi un utilizzo inferiore al 15% , poiché sono stati introdotti nuovi schemi diversificati, che fanno uso di farmaci come il Basiliximab, il Tacrolimus e il Micofenolato (Benfield MR *et al.*, Pediatr Transplantation 2003).

Il *Basiliximab* è un anticorpo monoclonale diretto contro la catena α del recettore dell'interleuchina 2 (antigene CD 25), espresso sulla superficie dei linfociti T in risposta ad uno stimolo antigenico. Questo farmaco trova indicazioni nella profilassi del rigetto acuto e nei

bambini la dose totale raccomandata, in funzione del peso corporeo, è pari a 40 mg suddivisa in due somministrazioni: la prima dose deve essere somministrata due ore prima dell'intervento chirurgico e la seconda dose 4 giorni dopo il trapianto.

Il *Tacrolimus* è un macrolide che agisce in una fase precoce della risposta immunitaria e insieme alla Ciclosporina, inibiscono l'attivazione delle cellule T con un meccanismo simile. Entrambi diventano attivi quando formano complessi con un recettore intracellulare endogeno, chiamato immunofillina. Questi complessi immunofillina-farmaco interferiscono con le vie di traduzione del segnale calcio dipendente intracellulare. Tacrolimus e ciclosporina agiscono come collante molecolare legando la calcineurina-calmodulina all'immunofillina, che normalmente non interagiscono. Il Tacrolimus ha importanti interazioni con vari farmaci come la claritromicina, il clotrimazolo, il ketoconazolo, la nifedipina ed i corticosteroidi che incrementano i livelli plasmatici del Tacrolimus attraverso l'inibizione del citocromo CYP3A. L'uso concomitante di FANS e Tacrolimus può comportare nefrotossicità a causa della riduzione della sintesi di prostaglandine. Particolare attenzione deve essere posta anche in seguito all'utilizzo di aciclovir e anfotericina B responsabili essi stessi di nefrotossicità. Per ultimo il Tacrolimus agisce con effetto inibitorio nei confronti del metabolismo dell'acido micofenolico. Per quanto riguarda le malattie linfoproliferative, è dato certo che il Tacrolimus aumenti l'incidenza di EBV-related PTLD (post transplant lymphoproliferative disorders).

Il *Micofenolato Mofetil* è un farmaco immunosoppressivo che blocca l'attivazione delle cellule T. L'acido micofenolico, suo metabolita attivo, inibisce la sintesi *de novo* del nucleotide guanosidico. Attualmente viene usato a dosaggi ridotti per evitare effetti collaterali quali le infezioni da virus erpetici ed alterazioni del metabolismo glucidico.

1.2. Rischio di infezione virale nel paziente trapiantato di rene.

Il rischio di contrarre un qualsiasi tipo di infezione è un problema che riguarda da vicino la popolazione dei pazienti trapiantati immunocompromessi. Inoltre tale rischio può variare di entità in relazione all'età del ricevente. Tra i riceventi adulti, il rischio di morte in seguito a infezione aumenta esponenzialmente con l'aumentare dell'età, tale da essere superiore nei pazienti con più di 65 anni rispetto ai pazienti con età di circa 18-49 anni (Meier-Kriesche HU *et al.*, Kidney Int 2001). Per contro, nel paziente pediatrico sembra esserci una correlazione inversa tra il rischio di contrarre un'infezione e l'età del ricevente: quindi il paziente con età inferiore a 5 anni presenta un rischio particolarmente elevato (Parada B *et al.*, Transplantation Proceedings 2005). In generale è più difficile riconoscere l'infezione nel paziente trapiantato rispetto alle persone che hanno un normale sistema immunitario, dal momento che i segni e i sintomi

dell'infezione vengono attenuati dalla condizione immunologica. Lo spettro dei potenziali patogeni si è allargato negli ultimi anni, e tal'una infezioni spesso progrediscono rapidamente. Dunque una diagnosi specifica e rapida è al momento indispensabile al fine di controllare e ridurre terapie immunosoppressive non essenziali. In alcune circostanze sono richieste delle analisi diagnostiche invasive, come nel caso della biopsia renale sull'organo prima del trapianto e durante il follow-up post trapianto, in maniera tale da identificare tempestivamente la presenza di patogeni opportunistici che potrebbero sfuggire ad altri sistemi d'indagine.

Per quanto riguarda in modo particolare le infezioni virali, gli effetti che queste causano nel rene trapiantato possono essere “diretti” o “indiretti”. Tale suddivisione permette di distinguere cioè gli effetti dati direttamente da un'infezione virale invasiva, con conseguente danno alle cellule e ai tessuti renali, dagli effetti causati indirettamente dalla risposta immunitaria anti-infiammatoria, ad esempio la produzione di citochine, chemochine o fattori di crescita. Inoltre, l'infezione virale nel paziente trapiantato in genere può alterare l'espressione degli antigeni di superficie, come gli antigeni di istocompatibilità, determinando il rigetto dell'organo trapiantato o l'induzione di una sregolata proliferazione cellulare e dunque fungere da fattore oncogeno (Kotton CN *et al*, JASN 2005). Il modo con cui si manifestano le infezioni virali nel paziente trapiantato di rene sono abbastanza atipiche. L'infezione causata dal poliomavirus BK (BKV) può manifestarsi come rigetto acuto dell'organo trapiantato o con uno specifico quadro istologico riconducibile ad una nefropatia associata a BKV. È importante trovare una corretta diagnosi del tipo di virus infettante in modo da selezionare la terapia antivirale specifica, quando esiste, o comunque in modo da evitare inutili trattamenti antimicrobici. In ogni caso, il primo tentativo terapeutico in presenza di infezione virale nel paziente trapiantato d'organo solido è ridurre la terapia immunosoppressiva. Qualora disponibili, si utilizzano farmaci antivirali e, se presenti, si trattano le infezioni (es. infezioni di più virus erpetici quali CMV, EBV, HHV6 o HHV7). È utile inoltre l'impiego di terapie adiuvanti, come immunoglobuline o immunoterapie adottive.

1.2.1. Epidemiologia delle infezioni nel paziente trapiantato.

Le infezioni che insorgono nel paziente che ha subito un trapianto di organo solido possono essere suddivise in più categorie, in parte sovrapponibili, come l'infezione trasmessa dal donatore al ricevente, l'infezione insorta nel ricevente, le infezioni nosocomiali e quelle acquisite in comunità.

- Le infezioni trasmesse dal donatore: il trapianto d'organo determina di per se la possibilità che un qualsiasi patogeno presente nel donatore venga trasmesso al ricevente. Questo vale in particolar modo per le infezioni virali, dal momento che sono causate da parassiti cellulari obbligati e quindi il trapianto di tessuti viventi è l'unica via effettiva per la trasmissione

di tali infezioni. Inoltre il microrganismo potrebbe essere presente nell'organo da trapiantare e non essere individuato al momento dell'analisi pre-impianto, sia perché si trova in una condizione di latenza o perché l'indagine eseguita non ha permesso di osservarne la presenza a causa dell'impiego di test inadeguati o perché non è stato incluso tra i patogeni da ricercare. In questo modo patogeni nuovi e sconosciuti potrebbero essere veicolati nel ricevente attraverso l'organo donato. Inoltre, quando l'organo deriva da un donatore deceduto, è possibile supporre che vi sia una contaminazione nosocomiale o avvenuta durante la conservazione dell'organo e anche che il donatore avesse un'infezione acuta in corso non diagnosticata. Al momento, lo studio del donatore per quanto riguarda le principali infezioni trasmissibili viene condotto mediante la ricerca di anticorpi virus-specifici con test sierologici. Dal momento che la sierconversione potrebbe non avvenire durante la fase acuta dell'infezione, la sensibilità di tali test sierologici non è del 100%, cosicché delle infezioni attive restano celate. Per migliorare l'indagine microbiologica sull'organo del donatore andrebbero impiegate delle metodiche più sensibili e più rapide, come i test molecolari.

- Le infezioni del ricevente: nel caso in cui vi siano delle infezioni attive nel ricevente, queste devono essere curate prima di effettuare il trapianto, dal momento che la terapia immunosoppressiva post-trapianto esacerberebbe tale processo infettivo. Quindi le infezioni che colpiscono il paziente prima del trapianto e che possono essere trattate, o quantomeno controllate, non impediscono il trapianto.

- Le infezioni nosocomiali: durante il ricovero in ospedale e in attesa del trapianto di rene, i pazienti in attesa dell'intervento chirurgico potrebbero contrarre una delle comuni infezioni nosocomiali. Tali infezioni sono però generalmente causate da batteri e più in particolare da ceppi antibiotico-resistenti (es. *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente).

- Le infezioni contratte in comunità: il paziente sottoposto a trapianto, a causa della sua situazione immunitaria compromessa, è più facilmente bersaglio di patogeni che per il soggetto sano non sono responsabili di patologie gravi (es. HCMV).

1.2.2. Infezione virale primaria o riattivazione.

Molte infezioni virali si manifestano nel paziente trapiantato di rene in seguito a “riattivazione” di un'infezione virale latente nell'ospite oppure proprio a livello dell'organo trapiantato. La natura della latenza dell'infezione virale è specifica per il tipo di virus e dipende dal tessuto interessato e dalla risposta immunitaria dell'ospite. Durante lo stato di latenza il virus può essere inattivo o in costante replicazione ma a bassi livelli (infezione persistente) determinati dallo stato immunitario dell'ospite. La riattivazione virale in seguito a trapianto di rene può essere determinata da molteplici fattori, come la terapia immunosoppressiva, il rigetto o lesioni

dell'organo trapiantato o per l'azione di citochine infiammatorie (Fishman JA *et al.*, NEJM 1998). La latenza e la riattivazione virale sono state studiate in modo accurato nel caso degli herpesvirus, che hanno come caratteristica peculiare quella di rimanere in uno stato latente in seguito all'infezione primaria. La latenza nei virus erpetici è caratterizzata dalla presenza di bassi livelli o addirittura dall'assenza di antigeni virali, scarsa trascrizione dei geni per il ciclo litico e l'espressione di trascritti virali associati alla latenza (Mitchell BM *et al.*, J Neurovirol 2003). Un altro esempio è costituito dalla possibilità di riattivazione del parvovirus B19 e del poliomavirus BK nel paziente immunocompromesso, i quali sono noti anche come patogeni con tropismo renale come verrà motivato più dettagliatamente nei successivi paragrafi (Bruggeman LA *et al.*, Clin J Am Soc Nephrol 2007).

1.2.3. Time course dell'infezione virale nel paziente trapiantato di rene.

Il rischio di infezione post trapianto varia in funzione di una serie di fattori comprendenti l'intensità, la virulenza e il meccanismo dell'esposizione virale, la natura del regime immunosoppressivo e la presenza/assenza di un'immunità antivirale preesistente. I programmi di immunosoppressione impiegati nel paziente trapiantato d'organo solido, quindi anche nel paziente trapiantato di rene, sono variati notevolmente negli ultimi anni e l'utilizzo degli inibitori della calcineurina, ciclosporina e tacrolimus, come pure gli steroidi alterano la suscettibilità alle infezioni virali. Inoltre può essere definito nella dinamica dell'insorgenza dell'infezione da B19, una sorta di pattern suddivisibile in fase precoce, intermedia e tardiva della comparsa di infezioni. Precocemente, cioè dopo qualche giorno dal trapianto, si manifestano particolari infezioni causate da patogeni opportunistici.

Nel *medio* periodo dopo il trapianto, cioè dopo 1 mese- 6 mesi dal trapianto, gli episodi febbrili sono spesso dovuti a rigetto d'organo trapiantato e da virus. Data la profilassi anti herpesvirus attuata da momento del trapianto, le infezioni da virus erpetici sono molto rare anche se è possibile osservarne. Dopo il sesto mese (fase tardiva) diminuisce la possibilità che, il paziente trapiantato d'organo solido, contraiga l'infezione in seguito anche alla modificazione del regime terapeutico antirigetto, che a questo punto non è più necessario. In generale però, i pazienti che hanno avuto prima del trapianto, un' infezione erpetica possono avere una riattivazione del virus dopo 1- 2 mesi dopo il trapianto. Le infezioni da HCMV, sia primarie che in seguito a riattivazione, tendono a comparire dopo 1-4 mesi da quando viene cessata la profilassi. Altre infezioni virali latenti, come ad esempio quelle causata da EBV e da VZV, possono riapparire ugualmente dopo 2-6 mesi dal trapianto. Inoltre circa metà dei casi di nefropatie associate a BKV si manifestano nei primi 6 mesi di follow-up post trapianto, ma l'altra metà è stata osservata in tempi più lunghi dal trapianto di rene.

1.3. Comuni infezioni virali nel paziente trapiantato di rene.

1.3.1. Virus erpetici e infezioni renali post trapianto.

I virus erpetici hanno ricevuto particolare attenzione nel monitoraggio delle infezioni post trapianto di rene dal momento che essi hanno un potenziale ruolo nel rigetto e un ruolo definito nelle cause di morbilità e mortalità del paziente trapiantato (Acott PD *et al.*, Transplant Proc 2004). Questi virus, costituiti da virioni muniti di envelope e un core contenente il genoma a dsDNA lineare, infettano il nucleo della cellula ospite producendo progenie virale che potrebbe condurre a danni irreversibili nella cellula infettata. Inoltre, fatto ancora più interessante ai fini del nostro studio, tali virus possono restare in latenza, dopo un infezione primaria (spesso asintomatica), e riattivarsi a seguito di lunghi periodi di immunosoppressione come accade nel paziente trapiantato.

È già nota la possibilità di trasmissione di un'infezione erpetica mediante trapianto per i virus HCMV, EBV, HHV6 e HHV8, i quali si riattivano in periodi specifici post-trapianto, sembrano contribuire al rigetto e, in generale, essere fattori di rischio di morbilità e mortalità nei trapiantati d'organo solido. Inoltre il loro ruolo immunomodulante può indurre un aumento dell'immunosoppressione, causando un aumento dell'effetto della una terapia antirigetto e del rischio di coinfezioni (Cainelli F *et al.*, Lancet Infect Dis. 2002).

È importante quindi conoscere la combinazione degli stati sierologici di donatore-ricevente (D/R) per valutare a priori la possibilità che questi virus erpetici hanno di infettare il ricevente e per poter definire la migliore strategia preventiva, ovvero se effettuare la profilassi (che consiste nel sottoporre l'intera popolazione di pazienti a terapia), o in alternativa una terapia presintomatica (*preemptive therapy*). Al momento tali strategie preventive vengono attuate per l'infezione da HCMV, che può essere monitorata con test sensibili e quantitativi, come l'antigenemia pp65 e la DNAemia (Squiffler J *et al.*, Journal of infections disease 2002; Kim C *et al.*, Transplantation 2003).

1.3.1.1. Infezioni da HCMV.

HCMV può essere considerato il patogeno virale per eccellenza per i pazienti trapiantati data la relativa possibilità di generare effetti *diretti*, a seguito di un infezione invasiva, e effetti *indiretti* dovuti alla risposta immunitaria a seguito dell'infezione (Kotton C N *et al.*, JASN 2005; Ljungman P *et al.*, J Infect Dis 2002).

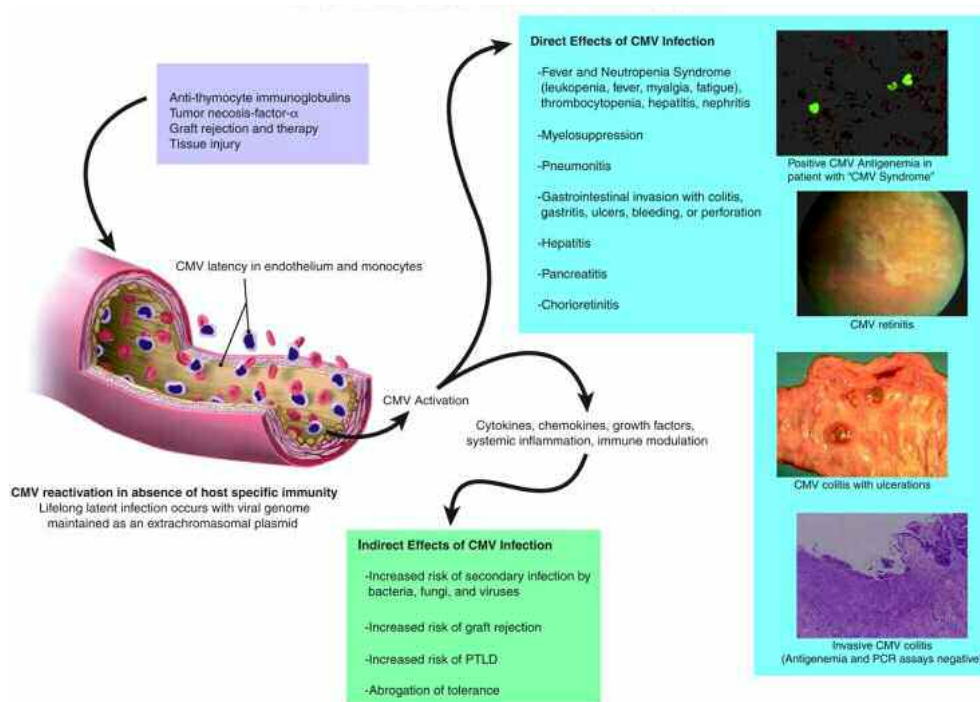


Figura 2. Processo di attivazione del HCMV ed effetti diretti e indiretti dell'infezione da HCMV nel paziente trapiantato di organo solido (Kotton CN *et al.* JASN 2005).

Generalmente l'infezione da HCMV non presenta sintomatologia particolare nel paziente sano mentre causa gravi patologie nel feto e nel paziente immunocompromesso, entrambe situazioni nelle quali il sistema immunitario non è del tutto funzionale (Mocarski ES *et al.*, Cell Microbiol 2004) e quindi permette al virus di sfuggire ai meccanismi di *clearance* dell'ospite. L'infezione da parte di HCMV riduce le difese dell'ospite predisponendolo inoltre alla possibilità di infezioni secondarie causate da funghi (es. Candida, Aspergillus) ed altre infezioni batteriche. La profilassi contro l'infezione da herpesvirus riduce il rischio di infezioni opportunistiche. Sempre l'infezione da HCMV contribuisce ad aumentare il rischio di rigetto dell'organo trapiantato, di disordini linfoproliferativi post trapianto (*post-transplant lymphoproliferative disorder*-PTLD) e alle infezioni da HHV6 e HHV7. Il meccanismo che controlla tali effetti è determinato dal funzionamento delle cellule T e dalle sintesi e presentazione degli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità.

L'infezione primaria da HCMV avviene quando nei riceventi sieronegativi vengono impiantati organi di donatori sieropositivi con infezione latente, in cui si assiste ad una successiva riattivazione e ad una disseminazione sistemica dell'infezione solo dopo l'impianto dell'organo nel ricevente. Mentre la riattivazione del HCMV si può verificare nel ricevente sieropositivo, quando il virus si riattiva in seguito all'immunosoppressione post-trapianto.

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 con valganciclovir per i 3-6 mesi successivi al trapianto (Taber DJ *et al.*, *Transpl Infect Dis* 2004). 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*). È particolarmente importante realizzare una buona prevenzione contro le infezioni da HCMV al fine di ridurre gli episodi di rigetto acuto, sia precoci che tardivi, che interessano il paziente trapiantato di rene (John GT., *Transplantation* 2004), anche se non tutti gli studi presenti in letteratura concordano nel riconoscere la relazione tra rigetto acuto e la patologia causata da HCMV (Waldman WJ *et al.*, *Intervirology* 1999).

1.3.1.2. Infezioni da EBV.

Nel paziente trapiantato immunocompromesso, l'infezione primaria da EBV viene identificata a seguito di una sintomatologia simil-mononucleosica che si presenta generalmente con linfocitosi, con o senza linfadenopatia e con faringite. In taluni casi si possono osservare anche meningite, epatite e pancreatite. Inoltre sono frequenti casi di riattivazione dell'infezione da EBV nel paziente trapiantato a causa di un'eccessiva immunosoppressione (Kotton C N *et al.*, *JASN* 2005). Inoltre l'infezione da EBV ha un ruolo centrale nell'insorgenza dei disordini linfoproliferativi post trapianto (*post-transplant lymphoproliferative disease*, PTLD), in particolar modo a seguito dell'infezione primaria che sembra aumentarne il rischio fino a circa 70 volte (Walker RC *et al.*, *Clin Infect Dis* 1995).

Nella maggior parte dei casi di PTLD, sono interessate le cellule B, dove EBV permane in latenza, ma in alcuni casi derivano da disordini delle cellule T o delle cellule NK. I casi di PTLD associati alle cellule T sono stati dimostrati nel 10-15% dei riceventi, soprattutto nel lungo periodo post trapianto: tale manifestazione potrebbe essere confusa con episodi di rigetto acuto o altri tipi di infezione virale. Inoltre il linfoma EBV-correlato rappresenta il 15% dei tumori che colpiscono il paziente trapiantato, e, per quanto riguarda il paziente pediatrico, la percentuale dei casi raggiunge il 51% con un rischio di mortalità che varia dal 40- 60%. L'analisi sierologica non è in grado di diagnosticare casi di infezioni acute da EBV né di PTLD nel paziente trapiantato. La valutazione del titolo virale mediante test quantitativi (EBV DNAemia) potrebbe invece essere di particolare utilità per diagnosticare e trattare adeguatamente i pazienti con PTLD (Baiocchi OC *et al.*, *Haematologica* 2004). Il tipo di trattamento clinico per i casi di PTLD dipende dallo stadio della malattia: nella forma policlonale, anche quando colpisce il paziente pediatrico, è possibile ottenere la regressione della malattia riducendo il regime immunosoppressivo. Una terapia alternativa è rappresentata inoltre dall'immunoterapia adottiva utilizzando cellule T stimulate (Straathof KC *et al.*, *Br J Haematol* 2002).

1.3.1.3. Infezioni da HHV6 e HHV7.

Entrambi i virus erpetici HHV6 e HHV7 sono sempre più riconosciuti come possibili patogeni responsabili di infezioni nel paziente trapiantato immunocompromesso. L'infezione causata da HHV6 e HHV7 è particolarmente comune nei bambini; inoltre circa il 90% degli adulti sono sieropositivi per tali infezioni. Il ruolo di questi due herpesvirus nei riceventi trapiantati di organo solido non è stato definito con esattezza.

- Per quanto riguarda **HHV6**, è generalmente associato a patologia caratterizzata da febbre, rash, ed encefaliti ed epatiti nei casi più gravi. È certo che la possibilità che questo virus erpetico sia associato alle patologie del paziente trapiantato nasce dalla consapevolezza che la sua possibilità di replicazione è strettamente associata al grado di immunosoppressione (Deborska D *et al.*, Transplant Proc 2003). Inoltre dati della letteratura, riferiscono che nel 100% dei pazienti che hanno conseguito infezione da HHV6 post-trapianto renale e, che erano *naive* per virus al momento del trapianto, si è verificata la perdita dell'organo trapiantato (Wade AW *et al.*, Transplantation Proceeding 1998).
- Per quanto riguarda **HHV7**, pur essendo ripetutamente riscontrato in bambini con sindromi febbrili acute, questo virus ha un ruolo quasi completamente sconosciuto nella patologia umana. Per quanto concerne le infezioni post trapianto d'organo solido, sembra che l'HHV7 e il HCMV fungano reciprocamente da cofattori nella progressione verso la malattia da HCMV nei pazienti immunodepressi (Šebeková K *et al.*, Pediatric Transplantation 2005).

La diagnosi di infezione da HHV6 e HHV7 viene effettuata mediante test molecolari qualitativi e quantitativi, con saggi di immunoistochimica sul tessuto dell'organo trapiantato (es. a livello della biopsia di follow-up) e/o mediante coltura delle cellule mononucleate del sangue periferico. Nonostante la stretta collaborazione e omologia tra HHV7 e HCMV, la profilassi anti HCMV che si effettua di routine nel paziente trapiantato di rene, sembra non avere alcun effetto sulle infezioni determinate da HHV7 (Brennan DC *et al.*, J Infect Dis 2000).

1.3.1.4. Infezioni da HHV8.

HHV8 è un herpesvirus strettamente associato ad EBV; identificato per la prima volta nel 1994 da lesioni di Sarcoma di Kaposi, è presente in modo variabile nelle diverse popolazioni e diversamente nell'adulto e nel bambino (Rimar D *et al.*, Isr Med Assoc J. 2006; Singh N *et al.*, Curr Opin Infect Dis. 1999). Inoltre tra le possibili vie di trasmissione dell'infezione da HHV8, sembra esserci proprio il trapianto di organi solidi, tanto che la sieroconversione avviene comunemente al momento del trapianto (Allen UD *et al.*, Pediatr Transplant. 2002; Milliancourt C *et al.*, Transplantation 2001). Il virus HHV8 è associato in particolar modo con il sarcoma di

Kaposi (KS), ma anche con la malattia di Castelman: patologie frequenti nel paziente immunocompromesso. Tra tutti i tumori derivati dal trapianto di organi solidi, il KS insorge molto precocemente a seguito del trapianto. Inoltre le cellule progenitrici del KS possono essere trasmesse dal donatore al ricevente. Il trattamento prevede anche in questo caso la riduzione della terapia immunosoppressiva oltre alla chemioterapia e al foscarnet (Luppi M *et al.*, Transplantation 2002).

1.3.1.5. Infezioni da VZV.

Per quanto riguarda l'infezione causata da VZV, è generalmente di tipo secondario, dovuta quindi alla riattivazione di sequenze virali già presenti nel rene del paziente pediatrico trapiantato, ed è tra le infezioni erpetiche più problematiche dal momento che tende a disseminare in circa 1/3 degli affetti, causando encefaliti e polmoniti (Gourishankar S *et al.*, Am. J Transplant 2004). In Italia è previsto un protocollo di vaccinazione anti-VZV, oltre ad altre vaccinazioni richieste, quali quelle per difterite, tetano, pertosse, poliomielite, *haemofilus influenzae*, epatite B, morbillo, rosolia, parotite, alle quali vengono sottoposti i bambini prima del trapianto di rene.

1.3.2. Poliomavirus e lesioni del rene trapiantato.

I poliomavirus sono virus sprovvisti di envelope, con un genoma dsDNA. In particolare due sono i tipi di poliomavirus responsabili di patologie nell'uomo: BKV e JCV. L'infezione determinata da questi virus riguarda prevalentemente il bambino: a 10 anni la totalità dei bambini possiede anticorpi anti-BKV e il 70–90% hanno immunità anti-JCV (Shah KV *et al.*, J Infect Dis 1973; Taguchi F *et al.*, Microbiol Immunol 1982). L'infezione primaria da BKV e JCV si verifica dunque nella prima infanzia e interessa generalmente il tratto respiratorio (Figura 3). La maggior parte di queste infezioni primarie sono asintomatiche ed entrambi i poliomavirus possono restare in latenza: nel rene, nel caso del BKV e nei linfociti per quanto riguarda JCV. In presenza di stati di immunosoppressione si può avere riattivazione del virus che causa dunque patologie sintomatiche.

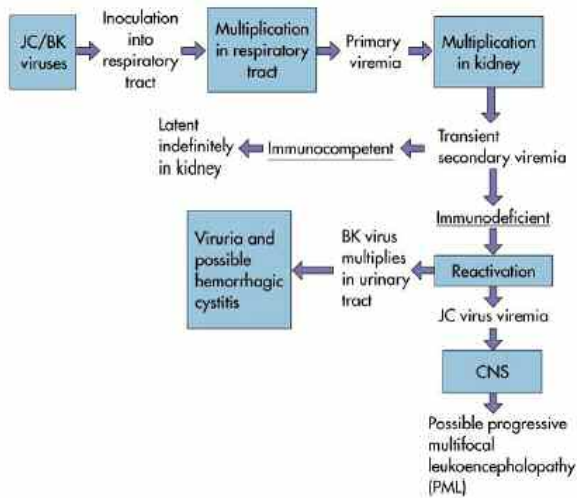


Figura 3. Dal libro Medical Microbiology, 5° edizione, Murray, Rosenthal & Pfaller, Mosby Inc., 2005, Fig. 52-8.

Tra i due poliomavirus, BKV è di certo quello più associato all'insorgenza di lesioni del rene trapiantato, infatti BKV è responsabile del 50 % dei casi di nefrite interstiziale e stenosi uretrale nei riceventi trapiantati di rene. Inoltre la prognosi per le nefropatie BKV correlate è scarsa dal momento che può causare la perdita del rene trapiantato nel 45% dei casi (Herman J *et al.*, *Pediatr Transplantation* 2004).

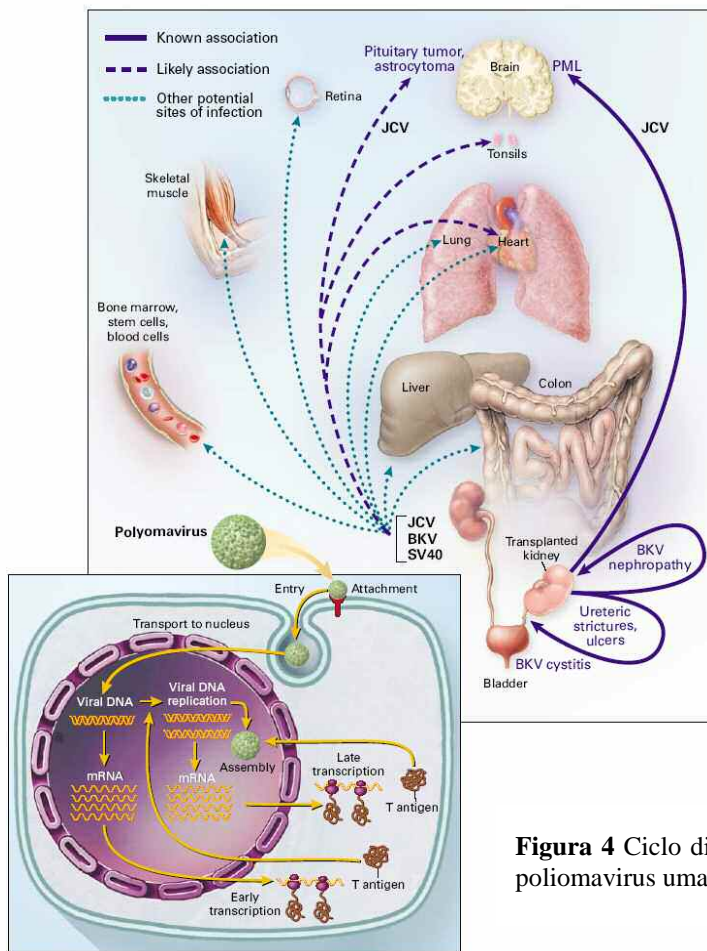


Figura 4 Ciclo di infezione e organi bersaglio dei vari poliomavirus umani (Fishman YA *et al.*, *NEJM* 2002)

JCV è invece responsabile di leucoencefalopatia multifocale progressiva (Figura 4) che colpisce il paziente immunocompromesso, come il paziente con AIDS o il paziente trapiantato in generale; è stato associato inoltre a rari casi di nefropatia insorta in seguito al trapianto di rene (Randhawa P *et al.*, Transplantation 2001).

Recenti studi hanno dimostrato la presenza del poliomavirus SV40 nel rene di pazienti pediatrici, anche se il ruolo di questo virus nella patologia umana rimane ancora dubbio (Milstone A *et al.*, Transplantation 2004).

Nel 2007 è stato identificato, in campioni clinici derivati dal tratto respiratorio, il terzo poliomavirus umano, il virus KI (KIV). La sua prevalenza nell'uomo, come pure il suo ruolo patogenetico sono del tutto sconosciuti (Allander T *et al.*, J Virol 2007). Successivamente, sempre nello stesso anno, è stato scoperto un quarto poliomavirus umano: si tratta del virus WU (WUV) (Gaynor AM *et al.*, PLoS Pathogens 2007). Entrambe questi nuovi poliomavirus sono stati riscontrati in secrezioni respiratorie provenienti da pazienti pediatrici affetti da patologie respiratorie acute. Anche se in diversi lavori recenti la presenza di KIV e di WUV è stata rilevata nel 1-3% degli aspirati nasofaringei di bambini, non si conosce ancora il tropismo esatto e la malattia associata a questi nuovi poliomavirus, in quanto i pazienti nei quali erano riscontrati i virus presentavano infezioni da parte di altri virus respiratori (Norja P *et al.*, J Clin Virol 2007; Bialasiewicz S *et al.*, J Clin Virol 2007). E' ipotizzabile che, analogamente a BKV e JCV, questi nuovi poliomavirus siano causa di malattia nel paziente immunocompromesso (Viscidi RP *et al.*, Science 2008).

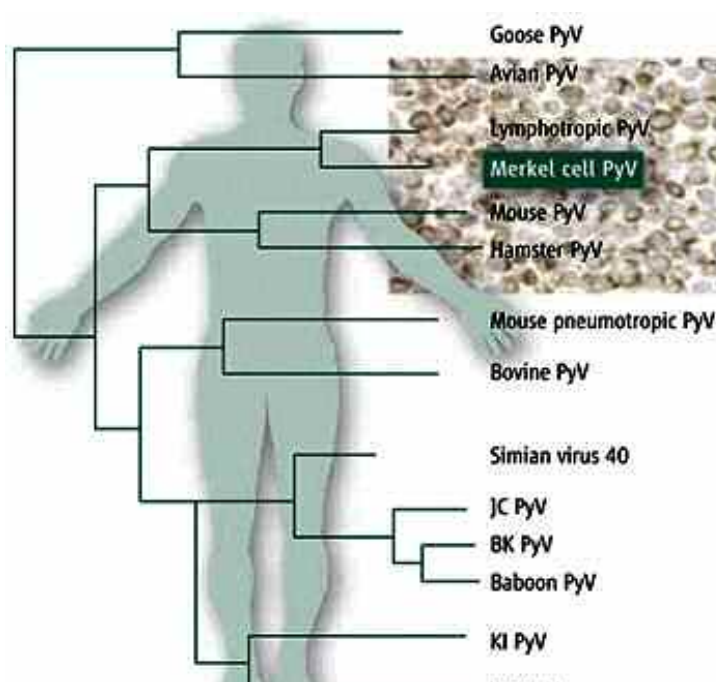


Figura 5. Filogenesi dei vari poliomavirus, umani e non, comprendente anche i nuovi poliomavirus KI PyV, WUPyV e Merkel cell PyV (Viscidi RP *et al.*, Science 2008).

1.3.2.1. Nefropatie associate a BKV (PVAN) nel paziente trapiantato di rene.

La nefropatia associata a BKV (*poyomavirus-associated nephropathy*, PAVN) è un'importante causa di disfunzione del rene trapiantato. La sua patogenesi è poco nota, anche se l'immunosoppressione è un importante fattore di rischio di riattivazione virale. La maggior parte dei casi di PVAN compaiono nei primi anni dopo il trapianto, e circa un quarto di questi vengono diagnosticati troppo tardi. La perdita del rene trapiantato in seguito a PVAN varia dal 10 al 80% dei casi, e dipende dal tipo di screening e intervento attuato (Hirsch HH *et al.*, NEJM 2002). La diagnosi di PVAN viene effettuata mediante esame citologico delle urine al fine di identificare la presenza di *decoy cells*: tale indagine ha il 100% di sensibilità nel diagnosticare infezione da BKV (Figura 6.B). Inoltre vengono ampiamente utilizzate metodiche molecolari per determinare la presenza e la carica di BKV DNA nel plasma e nelle urine di pazienti trapiantati di rene con sospetto di PVAN. Infatti, Hirsch *et al.* ha dimostrato come nei pazienti con PVAN il titolo virale nel plasma sono è più elevato rispetto ai pazienti trapiantati che non mostrano la patologia invasiva (Hirsch HH *et al.*, NEJM 2002). La diagnosi definitiva di PVAN richiede un'indagine istologica che identifichi le inclusioni intranucleari del poliomavirus nell'epitelio tubulare e/o nelle cellule parietali del glomerulo, spesso associate a necrosi delle cellule epiteliali (Figura 6.A).

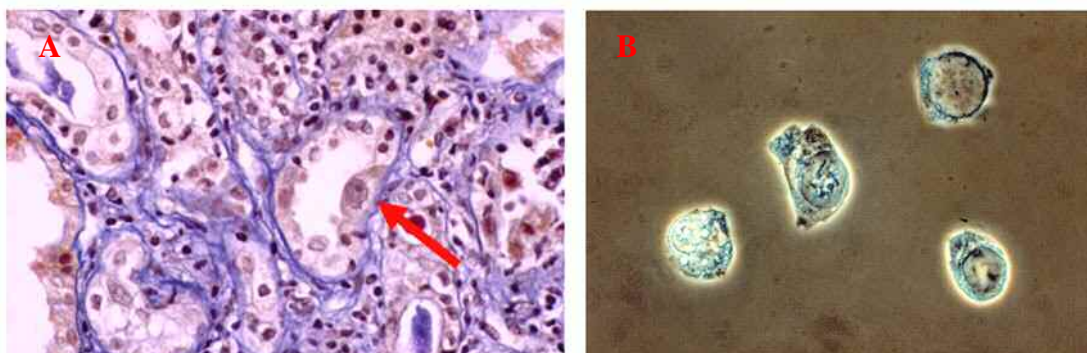


Figura 6. A. La freccia indica una tipica cellula tubulare infettata dal poliomavirus BK;
B. Sono *decoy cells* osservate con microscopio a contrasto di fase.

1.3.3. Il Parvovirus B19 nel paziente trapiantato di rene.

Il parvovirus B19 è un comune patogeno umano ed è diffuso ovunque. Studi epidemiologici, condotti sui dati di sierologia, indicano che circa l'85% degli adulti hanno avuto una passata infezione da parvovirus B19 (Young N *et al.*, NEJM 2004). Il parvovirus B19 è un membro della famiglia dei Parvoviridae appartenente alla famiglia degli Eritrovirus, che indica come il virus si replichi preferibilmente ed efficientemente nelle cellule progenitrici degli eritrociti. Esistono tre distinti genotipi di parvovirus B19: il prototipo B19, il tipo A6 o LaLi-simile e il tipo V9-simile,

che mostrano tra loro una divergenza genotipica del 10% e una differenza di proteine del 5% (Ekman A *et al.*, J Virol 2007). I virioni di B19 sono piccole particelle icosaedriche senza envelope che contengono il DNA genomico a singola elica, che codifica per due proteine capsidiche, la VP1 e la VP2, e una proteina non strutturale la NS1. La proteina virale VP2 coadiuva il legame tra il virus e la cellula ospite interagendo con il recettore cellulare, il globoside, noto anche come antigene P. Tale antigene è espresso abbondantemente negli eritroblasti mentre è espresso a bassi livelli in un limitato numero di tipi cellulari (Figura 7).

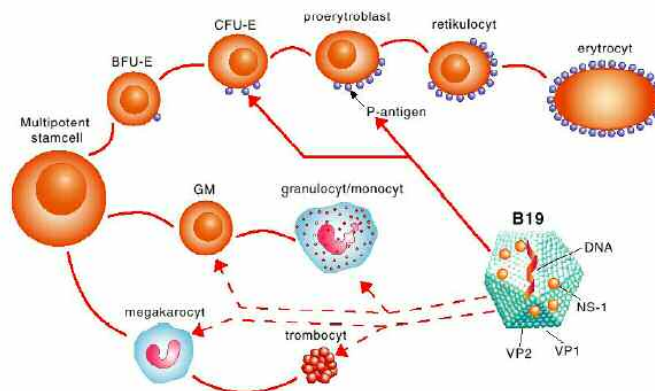


Figura 7. Espressione dell'antigene P nei progenitori eritroidi e nelle cellule suscettibili all'infezione da B19.

La proteina virale NS1 ha invece una funzione regolatoria nei confronti del ciclo vitale del virus ed è responsabile della citotossicità della cellula ospite e dell'apoptosi della cellula ospite (Moffatt S *et al.*, J Virol 1998). La proteina virale non strutturale NS1 induce l'apoptosi nelle cellule della linea eritroide (Moffatt S *et al.*, J Virol 1998). Il primo caso di infezione da B19 nel ricevente trapiantato di rene è stato descritto nel 1986 e da allora, numerosi casi di infezioni B19 correlate sono stati descritti in questa popolazione di pazienti immunocompromessi. Sulla base di un limitato numero di lavori, si è osservato che l'incidenza della viremia da B19 tra gli individui immunocompromessi, trapiantati di rene, compare durante il primo anno dal trapianto nel 0-12% dei casi (Eid AJ *et al.*, Clin Infect Dis 2006). La stima dell'incidenza delle infezioni da B19 nella popolazione di pazienti pediatrici trapiantati di rene è difficile ed è stata riportata di recente nel lavoro di Barzon L *et al.* (Barzon L *et al.*, JID 2009). Inoltre l'infezione da parvovirus B19 è spesso accompagnata dalla presenza di altri virus, come ad esempio l'herpesvirus HCMV o HHV6.

1.3.3.1. Patogenesi dell'infezione da parvovirus B19 e relativa risposta immunitaria.

L'infezione determinata dal parvovirus B19 nell'uomo può essere asintomatica o sintomatica, in funzione dell'età, dello stato ematologico e immunologico dell'ospite. L'immunità umorale è da sempre considerata la principale risposta che consente la clearance del

parvovirus B19 (Young N *et al.*, NEJM 2004), anche se è sempre più riconosciuta anche l'importanza della risposta cellulare nei confronti dell'infezione virale da B19. In ogni modo, il ripristino della condizione ematologica e la diminuzione del titolo virale di B19 coincidono con lo sviluppo di anticorpi virus specifici diretti contro le proteine strutturali. Gli anticorpi IgM sono rilevabili dopo circa 10-12 giorni dall'infezione e sono succeduti dalla produzione di anticorpi IgG dopo circa 2-3 settimane dall'infezione primaria, e presumibilmente persistono per tutta la vita dell'ospite e lo proteggono da successive infezioni (Corcoran A *et al.*, J Med Microbiol 2004). Dal punto di vista clinico, la manifestazione dell'infezione da parvovirus B19 nel paziente immunocompromesso differisce da quella osservabile in un paziente con un normale sistema immunitario. Infatti, in assenza di un effettiva risposta umorale o cellulare, la replicazione virale persiste per un lungo periodo portando così a viremie ricorrenti. È dunque possibile che tale infezione virale nel paziente immunocompromesso abbia un decorso fulminante oppure cronico.

1.3.3.2. *Trasmissione dell'infezione da parvovirus B19.*

Il principale modo con cui l'infezione da parvovirus B19 viene trasmessa nell'ospite normale è per via aerea attraverso goccioline di aerosol, mentre è meno definita la maniera di trasmissione dell'infezione da B19 nel ricevente trapiantato di rene. Come già detto, il tempo di comparsa dell'infezione da B19, dopo il trapianto di rene, varia da pochi mesi ad anni e tale variabilità dipende principalmente dai diversi modi con i quali l'infezione può essere trasmessa. Infatti, il paziente trapiantato può contrarre l'infezione da B19 sia mediante l'organo stesso oppure con delle trasfusioni di sangue o ancora in seguito a riattivazione del virus. Il fatto che tale infezione da parvovirus possa essere contratta in seguito al trapianto di organo solido è dimostrato dalla comparsa della sintomatologia tipica alcuni giorni dopo il trapianto come pure dalla presenza del DNA di B19 nel siero e nel tessuto del donatore (Murer L. *et al.*, JASN 2000). Mentre si conoscono i meccanismi che controllano e consentono la riattivazione di virus come ad esempio il HCMV, si sa invece molto poco su come avviene la riattivazione del parvovirus B19 e sui meccanismi con i quali viene mantenuto lo stato di latenza. È inoltre possibile che si verificino episodi di ri-infezione da B19 piuttosto che casi di riattivazione in seguito allo stato di immunosoppressione a cui è sottoposto il paziente trapiantato.

1.3.3.3. *Manifestazioni cliniche dell'infezione da parvovirus B19.*

Tra i pazienti trapiantati di rene che manifestano una persistente anemia derivata da cause sconosciute, l'incidenza dell'infezione da B19 è descritta in circa 23-44% dei casi (Cavallo R *et al.*, J Clin Virol 2003). Sempre nel paziente trapiantato di rene, sono state descritte numerose altre manifestazioni correlate all'infezione da B19. Ci sono pareri discordanti riguardo

l'associazione tra B19 e le glomerulopatie, le disfunzioni e il rigetto nei paziente che hanno subito il trapianto di rene (Ki CS *et al.*, Clin Transplant 2005). Più precisamente Moudgil *et al.* riferisce di casi di associazione tra glomerulopatie e presenza di B19 nel rene trapiantato; tale manifestazione patologica compare 2 settimane dopo una crisi ipoplastica associata a B19 (Moudgil A *et al.*, Kidney Int 2001). Inoltre casi di microangiopatia trombotica associata alla presenza del parvovirus B19 sono stati inoltre riportati in pazienti pediatrici trapiantati di rene (Murer L *et al.*, J Am Soc Nephrol 2000).

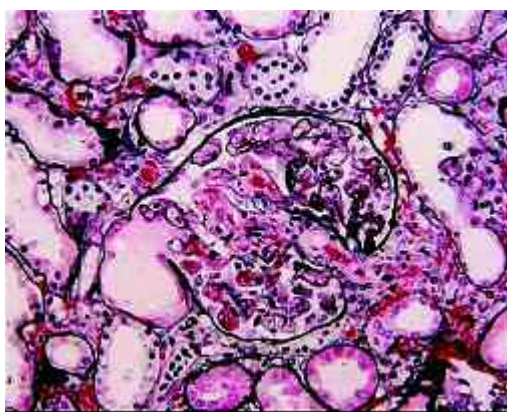


Figura 8. Immagine caratteristica di come viene caratterizzata al microscopio la *micrangiopatia trombotica* associata all'infezione da B19.

Infatti, Murer L *et al.* descrivono 4 pazienti che hanno sviluppato anemia aplastica associata a B19, circa 6-45 giorni dopo il trapianto di rene. In tutte le biopsie di rene dei pazienti sopradescritti è stato rilevato il DNA di B19, e tutti questi riceventi successivamente sono divenuti sieropositivi per le IgM contro B19. questi pazienti la disfunzione. Per spiegare un simile danno glomerulare, è stato proposta la possibilità che l'infezione da B19 sia stata diretta alle cellule endoteliali del rene. Inoltre la sensibilizzazione dell'endotelio glomerulare causata da altre forme di lesione, ad esempio il rigetto acuto, potrebbero aver incrementato la suscettibilità al danno renale indotto da B19.

1.3.3.4. Diagnosi e metodi di indagine dell'infezione da parvovirus B19.

Nell'ospite immunocompromesso l'infezione da B19 viene diagnosticata mediante l'indagine sierologica degli anticorpi specifici diretti contro VP1 e VP2. La presenza di IgM specifiche per il B19 indicano generalmente un'infezione acuta, anche se in alcuni pazienti l'infezione iniziale potrebbe persistere fino a 5 mesi o più. Data l'alterata funzionalità del sistema immunitario del paziente trapiantato, la produzione di anticorpi contro B19 potrebbe essere inadeguata e dunque i test sierologici per la diagnosi di infezioni potrebbero essere inadeguati per lo studio dell'infezione da B19 nel paziente immunosoppresso. Dunque, per il

paziente trapiantato occorre impiegare una tecnica diagnostica che permette di effettuare una diagnosi diretta dell'infezione da B19 come ad esempio le metodiche di amplificazione degli acidi nucleici virali (ad esempio la reazione a catena della polimerasi, PCR, la nested PCR e la RT-PCR quantitativa, per la ricerca dei trascritti virali). La PCR infatti è in grado di rilevare bassi livelli di DNA di B19 nel siero, nei tessuti per molti mesi successivi all'infezione primaria da B19, anche in presenza di IgG contro B19. Inoltre, studi di sorveglianza dei pazienti immunocompromessi hanno dimostrato che il DNA virale può essere individuato anche senza che l'individuo affetto abbia segni o sintomi dell'infezione. Occorre dire però che è ancora poco precisato quale sia il significato diagnostico della presenza della viremia.

La presenza di più varianti genotipiche di B19 ha introdotto ulteriori problemi in merito alle possibilità di fare diagnosi molecolare dell'infezione da B19; infatti i protocolli standard di PCR, eseguiti con combinazioni di primers non specifici, vanno ad identificare il genotipo 1 di B19 tralasciando i genotipi 2 e 3, fornendo così falsi risultati negativi o incompleti. Infatti dall'analisi retrospettiva di campioni di siero effettuata mediante PCR che permette di identificare tutti e tra i genotipi, è stato osservato che la viremia associata all'infezione da B19 persiste anche in fase di trattamento, e che tale viremia non era stata diagnosticata mediante il protocollo standard di indagine molecolare. Nonostante ci siano già sufficienti dati che associano l'infezione da B19 all'aumentato rischio di disfunzioni renali successive al trapianto di rene, non c'è ancora un'universale indicazione di indagine/studio di B19 nel rene del donatore e del ricevente durante le valutazioni pre trapianto. Una maggiore vigilanza nei confronti di questo tipo di infezione virale è richiesta per il paziente pediatrico, il quale potrebbe non essere mai stato esposto al virus, o anche per le donne, che hanno subito precedentemente alla gravidanza, un trapianto d'organo solido: infatti è riconosciuto un rischio maggiore di insorgenza di complicazioni a carico del feto nel momento in cui si ha un'infezione attiva o una riattivazione da B19.

1.3.3.5. Terapia delle infezioni da parvovirus B19.

A tutt'oggi non sono disponibili agenti antivirali specifici per la terapia dell'infezione da parvovirus B19 anche se si attuano una serie di strategie terapeutiche non specifiche impiegate soprattutto per il trattamento delle manifestazioni ematologiche nel paziente trapiantato. Più precisamente vengono utilizzate come trattamenti opzionali dell'anemia che si manifesta conseguentemente all'infezione da B19:

- la riduzione o l'interruzione temporanea della terapia immunosoppressiva;
- la modificazione dei tipi di farmaci immunosoppressori impiegati (es. tacrolimus al posto della ciclosporina);
- somministrazione intraveda di immunoglobuline e concomitante riduzione dell'immunosoppressione.

SCOPO DELLO STUDIO

Obiettivi del presente studio sono:

A) valutare se le infezioni virali, sia sistemiche che intrarenali, sono fattori di rischio per lo sviluppo di rigetti acuti e/o lesioni croniche nel rene trapiantato in pazienti pediatrici. A tal fine, è stata eseguita una valutazione retrospettiva della prevalenza delle sequenze virali in biopsie renali effettuate serialmente nel follow-up post trapianto. La presenza di sequenze virali è stata correlata con i con la funzionalità renale e con la presenza di lesioni istologiche nel rene trapiantato.

B) valutare se la presenza di sequenze virali in biopsie del rene del donatore, nel liquido di conservazione e nel liquido di lavaggio del rene da trapiantare sono più predittivi delle indagini sierologiche del rischio di trasmissione di infezioni virali al ricevente.

C) indagare l'eventuale presenza dei nuovi poliomavirus WU_{py}V, KIP_{py}V nel rene trapiantato. Come i poliomavirus BK e JC, anche i nuovi poliomavirus potrebbero avere tropismo renale ed essere responsabili di patologie nei pazienti immunodepressi.

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1. PAZIENTI

2.1.1. Casistica dei pazienti in esame.

Riceventi: I pazienti “riceventi” inclusi nello studio sono rappresentati da 69 bambini e giovani adulti (età media 13 anni, range 2-27) dei quali 28 femmine (età media 12.5 anni, range 2-26) e 41 maschi (età media 14 anni, range 2-27), invece 13 avevano meno di 6 anni. Inoltre 4 pazienti hanno ricevuto il rene da familiari viventi e 65 ricevono il rene da donatore deceduto. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a trapianto di rene nel periodo 2000-2005 presso la Divisione di Nefrologia Pediatrica dell’ Ospedale di Padova e per tutti è disponibile un periodo di follow-up di almeno 2 anni in cui sono stati effettuati controlli clinici e biochimici seriati a 1, 6, 12 e 24 mesi post trapianto per monitorare l’andamento clinico dei pazienti e valutare l’efficacia e la tollerabilità della terapia in relazione alla funzionalità renale (creatinina e/o proteinuria di > 20%). Durante i ricoveri previsti a 6, 12, 24 mesi dal trapianto, oltre al momento del trapianto, è stata inoltre eseguita la biopsia renale con lo scopo di individuare eventuali markers sia istologici che immunoistochimici di danno renale progressivo.

Donatori: nello studio delle infezioni del donatore che potrebbero essere trasmesse al ricevente, i pazienti “donatori” studiati sono 74 (età media di 12 anni, range 1-58) di questi 14 avevano meno di 6 anni, inoltre 17 erano femmine e 58 maschi. In tutti è stata eseguita al momento del trapianto la biopsia renale (biopsie *baseline*).

2.1.2. Regime immunosoppressivo.

Durante i primi 6 mesi post-trapianto, tutti i pazienti hanno ricevuto un regime terapeutico immunosoppressivo comprendente basiliximab, prednisone, in associazione con ciclosporina A (24 pazienti) oppure tacrolimus (45 pazienti) più micofenolato mofetile. La terapia con steroidi è stata sospesa dopo 6 mesi dal trapianto di rene nei casi in cui vi erano evidenze di ricetto acuto clinico o subclinico (Ferraresso M et al., Transplantation 2005; Montini G et al., 2005). Per quanto concerne la profilassi post trapianto, tutti i pazienti hanno ricevuto un trattamento antibiotico (cefalosporine di seconda o terza generazione) oltre ad una attenta profilassi anti-HCMV per 6 mesi dopo il trapianto, sulla base del seguente criterio (Tabella 1): in presenza di

donatore negativo (D-) e ricevente positivo (R+) veniva somministrato Acyclovir (40 mg/kg/die); nei casi di D+/R- si somministrava invece gancyclovir (50 mg/kg/die) unitamente a immunoglobuline per via endovenosa (100 mg/kg/dose per tre dosi). In presenza di R+/D+ o di R- con status del donatore non noto (D?) andava somministrato solo gancyclovir (50 mg/kg/die).

D/R	Profilassi
D-/R-	No profilassi
D-/R+	Acyclovir (40mg/kg/die)
D+/R+ o D?/R-	Gancyclovir (50mg/kg/die)
D+/R-	Gancyclovir (50mg/kg/die)+ Ig ev (100mg/kg/dose)

Tabella 1. Tipo di profilassi anti-CMV utilizzata per i pazienti pediatrici trapiantati di rene

Non è stata eseguita profilassi antifungina. Le infezioni virali, sintomatiche o asintomatiche, sono state trattate come riportato in letteratura del gruppo della Dr.ssa Murer cioè secondo il protocollo rappresentato nella figura 9 (Montini G *et al.*, Transpl Int 2005).

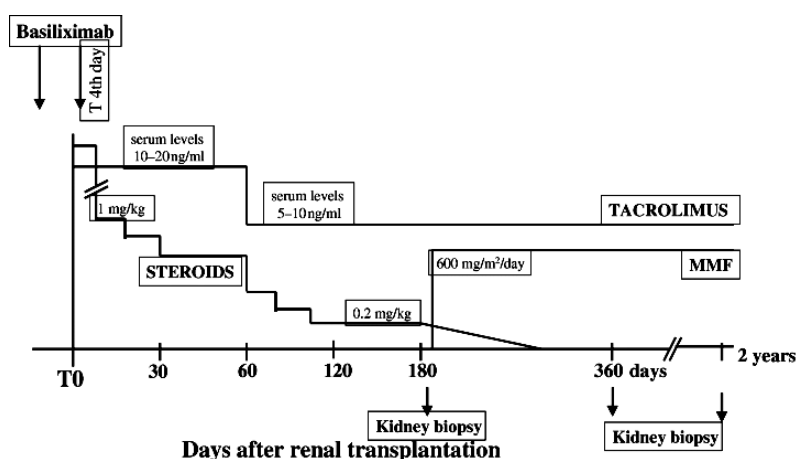


Figura 9. Protocollo clinico adottato nei pazienti pediatrici trapiantati di rene e arruolati nel presente studio (Montini *et al.* Transpl Int 2005)

2.2. MATERIALI

2.2.1. Biopsie

Le biopsie sul rene del donatore (*baseline*) sono state eseguite al momento del trapianto (“*bench surgery*”) mediante un ago di 1.2 mm di diametro esterno che permetteva di ottenere un campione di tessuto di 0.9 x 20 mm; tali biopsie sono state congelate rapidamente in azoto liquido quindi conservate a -80°C fino al momento dell’indagine molecolare. Oltre ad essere

impiegate per questa parte dello studio delle sequenze virali, le biopsie sono state impiegate nella routine della valutazione istologica del rene prima dell'impianto.

Le biopsie renali di follow-up sul ricevente sono state eseguite sotto guida ecografia e per ciascuna biopsia sono stati conservati 2 campioni: uno per essere incluso in paraffina e l'altro congelato a -80°C .

Le biopsie di follow-up sono state eseguite al fine di effettuare l'analisi istologica e la successiva classificazione secondo Banff 1997-Banff 05 (Racusen LC *et al.*, Kidney Int 1999; Solez K *et al.*, Am J Transplant 2007). Tutte le biopsie sono state analizzate in doppio cieco e sono state considerate adeguate ai fini della valutazione istologica quelle contenenti 7 glomeruli e 1 arteria; quindi sono state descritte e classificate secondo le seguenti categorie: Normale, classe 1 secondo Banff; Rigetto acuto, classe 3 (alterazioni borderline) e classe 4 (rigetto acuto T-mediato) secondo Banff e Lesioni croniche (tutte le lesioni croniche glomerulari, vascolari, tubulari ed interstiziali elencate nella classificazione di Banff).

2.2.2. Campioni di Sangue.

Per ogni istante del follow-up (*baseline*, 6, 12, 24 mesi) in cui è stata effettuata la biopsia sono stati raccolti e analizzati anche campioni di sangue del ricevente per le valutazioni molecolari (DNAemia) e per lo studio sierologico effettuato presso l'UOC Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova. I relativi risultati sono stati raccolti ed analizzati nel presente lavoro di tesi.

2.2.3. Campioni dell' "unità rene" del donatore

- **Biopsie**: vedi 2.2.1.
- **Soluzione di conservazione (PS)**: consiste nel liquido di raccolta, conservazione e trasporto del rene dopo l'espianto e fino al momento dell'impianto. La sospensione si compone della soluzione Euro-Collins, UW, oppure Celsior. Sono stati raccolti 50 ml di questa soluzione per ogni rene/donatore e conservati a -80°C per l'indagine molecolare della presenza del virus.
- **Soluzione di lavaggio (WS)**: la soluzione di Ringer lattato è stata utilizzata per effettuare il lavaggio del rene prima di procedere con l'impianto dell'organo nel ricevente. Tale procedura di lavaggio è stata condotta incanalando l'arteria e la vena renale. 50 ml di soluzione di lavaggio è stata raccolta e conservata a -80°C per l'indagine molecolare della presenza del virus. La soluzione di lavaggio non era disponibile in 8 casi.

Al fine di standardizzare il protocollo di processamento delle diverse soluzioni sono stati recuperati 200 μl di frazione cellulare in seguito a centrifugazione a 3800 rpm per 10 minuti di 50 ml di liquidi di lavaggio e dai liquidi di trasporto (Figura 10).

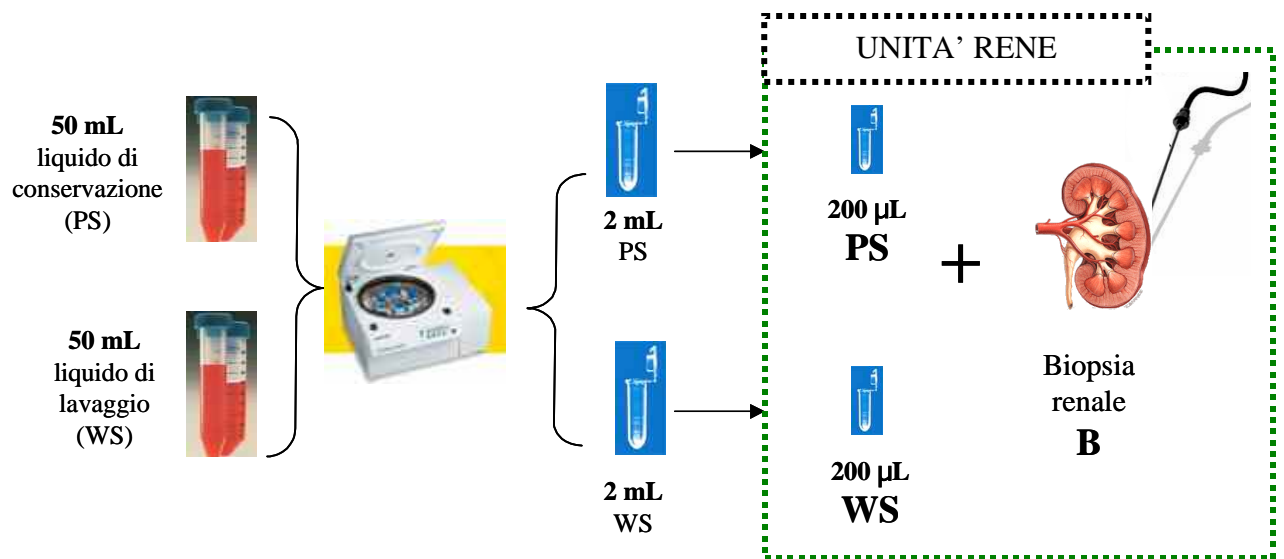


Figura 10. Schema riassuntivo del processamento dei diversi campioni del donatore e che costituiscono l'unità rene.

È possibile ipotizzare che i diversi tipi di campioni, tutti appartenenti al donatore, quali la biopsia, il liquido di conservazione e il liquido di lavaggio, possano essere diversamente costituiti da varie componenti cellulari. In particolare la biopsia risulta, ovviamente, arricchita di cellule renali residenti, il liquido di conservazione contiene invece cellule ematiche circolanti oltre a cellule proprie del rene e il liquido di lavaggio sarebbe costituito da cellule ematiche come pure da cellule endoteliali rilasciate durante il processo di lavaggio (Figura 11).

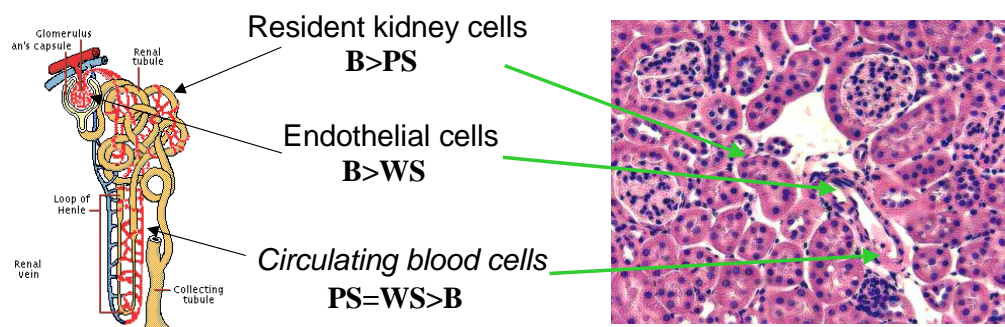


Figura 11. Le biopsie, i liquidi di conservazione e di lavaggio sono arricchiti di diverse componenti cellulari del rene del donatore.

2.3. METODI

2.3.1. Determinazione delle sequenze genomiche virali mediante Real time PCR quantitativa.

Circa 100 ng di DNA estratto dai differenti campioni biologici in esame, biopsia (tessuto congelato e paraffinato), sangue e frazione cellulare derivata dai liquidi di conservazione e di trasporto, sono stati analizzati per la ricerca del DNA virale mediante la metodica della Real time PCR quantitativa. La sensibilità della ricerca di sequenze virali mediante Real time PCR quantitative è di 10 copie genomiche per reazione (100 ng DNA) per tutti i virus. Sono stati ritrovati valori di positività per DNA virale simili nei campioni congelati e nei paraffinati, indicando che, il tipo di matrice e il protocollo di purificazione del DNA, non influiscono sui risultati. Per lo più, l'identificazione dello stesso DNA virale è stata confermata in successivi campionamenti temporali dello stesso paziente, a volte conservati in modo diverso (paraffinati e/o congelati).

2.3.1.1. Estrazione del DNA dai campioni biologici:

Tutte le procedure di estrazione degli acidi nucleici sono state condotte in doppio in modo da confermare i risultati ottenuti. Per ogni diverso processo di purificazione è stato incluso un campione d'acqua che funge da controllo negativo di estrazione che serve a monitorare eventuali contaminazioni derivate dal processo di stesso. Il DNA estratto è stato quantificato tramite lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 260 nm con lo strumento Nanodrop Biophotometer (Eppendorf) che, impostato per il tipo di acido nucleico da misurare e per la sua diluizione, consente di risalire direttamente alla concentrazione della soluzione in esame ed al suo rapporto A260/A280, che è indice del grado di purezza. La quantità del DNA è stata anche stimata mediante amplificazione con real-time PCR quantitativa del gene BGL codificante la β -globina umana, il quale è presente in ogni cellula in due copie.

A) Purificazione del DNA dalle biopsie paraffinate e congelate.

- a. Per le *biopsie incluse in paraffina*, è stata utilizzata una tecnica di purificazione di acidi nucleici che permettesse di eliminare la paraffina senza alterare il DNA. La metodica si avvale del kit di estrazione di DNA da tessuti inclusi in paraffina EX-WAX™ (Chemicon© International Inc.). Per ogni estrazione sono state impiegate 3-5 sezioni di tessuto paraffinato dello spessore di 3-4 μ m. Le sezioni sono state sminuzzate allo scopo di aumentare la superficie di contatto con i reagenti necessari all'estrazione. Dopo un passaggio in etanolo al 100% per eliminare la paraffina, il DNA è stato reso

accessibile per i passaggi successivi utilizzando proteinasi K; le nucleasi citoplasmatiche sono state invece precipitate tramite “salting-out”. Nei passaggi successivi il DNA è stato precipitato, seccato e risospeso. La resa di tale protocollo di estrazione è di 250 ng DNA (6 ng/ml).

- b. Per le *biopsie congelate* la metodica di purificazione del DNA si è avvalsa del kit di estrazione QIAamp® DNA mini kit (QIAGEN GmbH), che fa uso di colonnine con membrana di gel di silice. La quantità di DNA estratta dalle biopsie congelate è di 2 µg DNA (10 ng/ml).

B) Purificazione del DNA da sangue.

I protocolli di purificazione di DNA virale da sangue variano per i diversi virus. La ricerca delle sequenze genomiche virali di EBV è stata condotta su DNA purificato dalla frazione linfocitaria pari a 1×10^7 linfociti, la ricerca del genoma di HCMV è stata effettuata a partire da DNA estratto dalla componente ematica mononucleare, 2×10^7 monociti, mentre la ricerca del DNA di BKV e di B19 è stata condotta sul DNA totale estratto da 200 µl di campioni di plasma come descritto in dettaglio nei lavori di Biasolo *et al.* 2003 e Mengoli *et al.* 2004. In ogni caso le purificazioni del DNA totale (genomico e virale) sono state effettuate con il kit QIAamp DNA blood kit e attraverso la stazione di estrazione automatizzata (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany).

C) Purificazione di DNA dalle frazioni cellulari delle soluzioni di conservazione e di lavaggio del rene del donatore.

Dopo una iniziale valutazione in cui è stato rilevato che la presenza dei genomi virali era superiore nella frazione cellulare ottenuta dalla centrifugazione delle soluzioni rispetto alle soluzioni non centrifugate, la ricerca dei genomi virali a livello delle soluzioni di conservazione e di lavaggio è stata effettuata soltanto a partire da DNA estratto dalle frazioni cellulari di queste soluzioni. Quindi, il DNA è stato purificato da 200 µl delle frazioni cellulari con il kit QIAamp® DNA mini kit (QIAGEN GmbH). La quantità di DNA estratto è di circa 5 µg per le frazioni cellulari ottenute dai liquidi di conservazione e circa 10 µg dalle frazioni cellulari dei liquidi di lavaggio.

2.3.1.2. Real time PCR quantitativa per la ricerca del DNA virale.

La Real-time PCR, che può essere considerata un' avanzamento della metodica di PCR, permette di monitorare l'andamento della reazione di amplificazione durante il suo svolgimento mediante l'impiego di marcatori fluorescenti e di quantificare in modo relativo e assoluto la quantità di materiale di partenza (Figura 12). La dimostrazione dell'avvenuta amplificazione si

ha qualora la fluorescenza emessa durante la reazione di PCR supera il valore soglia (*threshold*), ovvero il valore che distingue un segnale significativo dal rumore di fondo (calcolato in genere dai valori di fluorescenza emessi dai campioni nell'intervallo tra il 3° e il 15° ciclo di PCR). Il ciclo di PCR al quale il segnale di fluorescenza del campione supera il valore soglia è definito “ciclo soglia” (CT, *threshold cycle*). La quantificazione del target, nel caso specifico del DNA virale, può essere eseguita sia in modo relativo (basandosi, cioè, sul CT), sia in modo assoluto (cioè sulla base della curva standard, ottenuta da diluizioni progressive di una quantità nota di copie del target, vedi preparazione della curva standard).

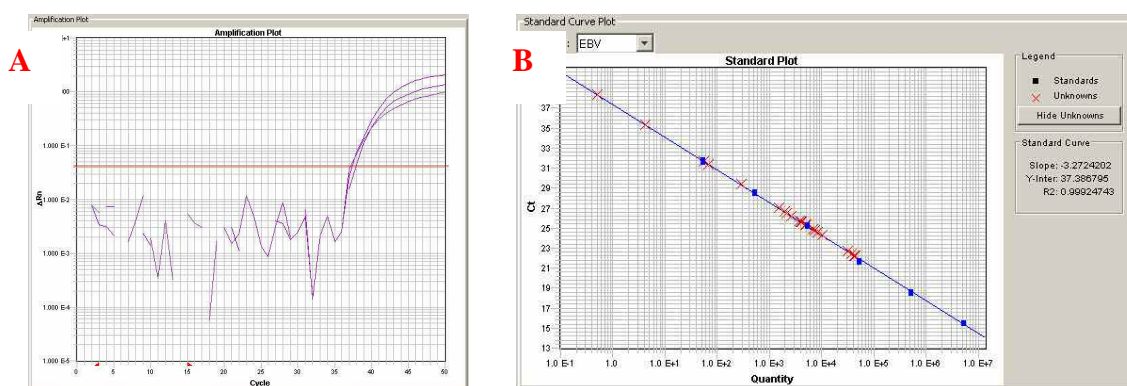


Figura 12. A. Plot di amplificazione ottenuto come risultato della fluorescenza emessa durante la corsa della reazione di Real time PCR e B. regressione lineare di una curva standard impiegata per effettuare una quantificazione assoluta dei campioni positivi.

Il CT correla fortemente con il numero di copie iniziali del target: infatti, rappresentando il valore di CT in funzione del logaritmo del numero di copie del target stesso, si ottiene una relazione lineare che va a definire la curva standard. L'intensità della fluorescenza aumenta in funzione della concentrazione dello specifico amplificato su cui è disegnata la sonda. In questo lavoro di tesi sono state utilizzate sonde di tipo TaqMan™, che consistono in oligonucleotidi di 25-30 basi, disegnati per essere complementari ad una sequenza del genoma virale. Le sonde presentano all'estremità 5' un fluoroforo denominato reporter (es. FAM) ed all'estremità 3' un gruppo colorante denominato quencher (es. TAMRA), in grado di mascherare l'emissione luminosa del reporter. Nella fase di elongazione della PCR, l'enzima Taq polimerasi rilascia il reporter grazie alla sua attività 5'-3' esonucleasica. In questo modo il fluoroforo in soluzione non subisce più l'inibizione del quencher e può emettere fluorescenza. L'utilizzo delle sonde TaqMan™, al posto degli altri intercalanti come il SYBR® Green, rende la tecnica di Real-time PCR un metodo più specifico per la determinazione di sequenze di DNA, in quanto alla specificità data dai primer si aggiunge quella data dalla sonda.

Per determinare la concentrazione di DNA target (genoma virale) presente nel campione, esso è amplificato insieme alla curva standard. Il CT del campione ignoto è rapportato alla curva

standard, da cui è possibile risalire al numero di copie iniziali del target presente nei campioni in esame.

Le sequenze dei primer senso ed antisense e le sonde TaqMan™ utilizzate per la ricerca di DNA virale, sono riportate nella Tabella *Primers e Sonde*.

La reazione di Real time PCR è stata eseguita secondo il seguente protocollo:

in un volume finale di reazione di 25 µl, sono stati utilizzati: 5µl del campione (circa 100ng di DNA estratto dai campioni), 12.5 µl di 2x TaqMan™ Master Mix (Applied Biosystem), i due primer (10 µM ciascuno) e la sonda 0,4 µM. Le condizioni di amplificazione erano le seguenti: 2 min a 50°C per consentire l'azione dell'enzima uracil-N-glicosilasi (UNG) che ha la funzione di rimuovere gli uracili eventualmente incorporati nel doppio o singolo filamento di DNA, prevenendo quindi la riamplicazione di prodotti di PCR precedentemente amplificati; 10 min a 95 °C per attivare la polimerasi; 45 cicli composti da una fase di denaturazione (15 secondi a 95 °C) e una fase di annealing-estensione (1 min a 60 °C).

Le amplificazioni sono state condotte su un termociclatore ABI-PRISM 7900HT Real Time PCR System (Applied Biosystems). La quantificazione del DNA virale è stata effettuata rispetto a curve standard, costituite da diluizioni di plasmidi pGEM®-T Easy (Promega) (vedi *Preparazione della curva standard*) nei quali era subclonata la sequenza target per la reazione di amplificazione.

Tabella “*Primers e sonda*”: combinazioni di primers e sonde utilizzate per l’identificazione delle sequenze virali in Real time PCR.

Sequenza virale	Gene Target	Primers/Sonda	Oligonucleotide sequence (5’-3’)	Posizione Nucleotidica	GenBank Accession no.
Human Herpesviruses					
HCMV					
(Mengoli et al. J. Med. Virol 2004)	UL123	Forward	TCATCCACACTAGGAGAGCAGACT	172304-172328	NC 001347
		Reverse	GCCAAGCGGCCTCTGAT	172423-172440	
		Probe	ACTGGGCAAAGACCTTCATGCAGATCTC	172353-172380	
EBV					
(Biasolo et al. J Med Virol 2003)	BLLF1	Forward	TCAACCTCTTCCATGTCACTGAGA	78019-77996	NC 009334
		Reverse	TGGGTGAGCGGAGGTTAGTAA	77912-77932	
		Probe	TCAGCCCCTCCACCAGTGACAATTC	77973-77949	
HHV-6 DNA (I)					
(Watzinger <i>et al.</i> J Clin Microbiol 2004)	polymerase gene	Forward	GAA GCA GCA ATC GCA ACA CA	57517-57536	NC 001664
		Reverse	ACA ACA TGT AAC TCG GTG TAC GGT	57568-57590	
		Probe	AAC CCG TGC GCC GCT CCC	57544-57561	
HHV-6 DNA (II)					
(Collot <i>et al.</i> J Clin Microbiol 2002)	U22	Forward	TCG AAA TAA GCA TTA ATA GGC ACA CT	35087-35112	X83413
		Reverse	CGG AGT TAA GGC ATT GGT TGA	35163-35183	
		Probe	CCA AGC AGT TCC GTT TCT CTG AGC CA	35125-35150	
HHV-7					
(Watzinger <i>et al.</i> J Clin Microbiol 2004)	Major capsid protein	Forward	CCC AAC TAT TTA CAG TAG GGT TGG TG	84230-84255	U43400
		Reverse	TTT AGT TCC AGC ACT GCA ATC G	84332-84353	
		Probe	CTA TTT TCG GTC TTT CCA ATG CAC GCA (AS)	84258-84284	

HHV-8					
(Watzinger <i>et al.</i> J Clin Microbiol 2004)	ORFc 26	Forward	GTG CTC GAA TCC AAC GGA TT	47308–47327	U75698
		Reverse	CGA TAT TTT GGA GTA GAT GTG GTA CAC	47392–47418	
		Probe	TGT TCC CCA TGG TCG TGC C	47336–47354	
HSV-1					
(Watzinger <i>et al.</i> J Clin Microbiol 2004)	US 4 gene	Forward	TTC TCG TTC CTC ACT GCC TCC C	137279–301	NC 001806
		Reverse	GCA GGC ACA CGT AAC GCA CGC T	137423–445	
		Probe	CGT CTG GAC CAA CCG CCA CAC AGG T (AS)	137379–404	
HSV-2					
(Watzinger <i>et al.</i> J Clin Microbiol 2004)	Glycoprotein D gene	Forward	CGC CAA ATA CGC CTT AGC A	99–117	AF021342
		Reverse	GAA GGT TCT TCC CGC GAA AT	150–169	
		Probe	CTC GCT TAA GAT GGC CGA TCC CAA TC	123–148	
VZV					
(Watzinger <i>et al.</i> J Clin Microbiol 2004)	ORF 38	Forward	AAG TTC CCC CCG TTC GC	69313–69329	X04370
		Reverse	TGG ACT TGA AGA TGA ACT TAA TGA AGC	69368–69394	
		Probe	CCG CAA CAA CTG CAG TAT ATA TCG TCT CA	69336–69364	
Polyomaviruses					
BKV					
(Leung <i>et al.</i> Blood 2001)	VP1	Forward	AGT GGA TGG GCA GCC TAT GTA	2391-2412	AB301103
		Reverse	TCA TAT CTG GGT CCC CTG GA	2487-2466	
		Probe	AGG TAG AAG AGG TTA GGG TGT TTG ATG GCA CAG	2426-2458	
JCV					
(McNees <i>et al.</i> J Clin Virol 2005)	TAg	Forward	TTC TTC ATG GCA AAA CAG GTC TT	4341-4353	AB127017
		Reverse	TTCCACCAGGATTCCCATTC	4377-4396	
		Probe	CCACTTCTCATTAATG	4358-4374	

SV40					
(McNees <i>et al.</i> J Clin Virol 2005)		Forward	GAT GGC ATT TCT TCT GAG CAA A	4486-4507	AF316139
		Reverse	TTC CAC CAC TGC TCC CAT TC	4530-4550	
		Probe	TTT CCT CAT TAA A	4513-4525	
<i>Parvovirus B19</i>					
PV-B19					
Watzinger <i>et al.</i> J. Clin. Microbiol 2004 ;	VP2	Forward	TGG CCC ATT TTC AAG GAA GT	3017-3036	Z68146
		Reverse	CTG AAG TCA TGC TTG GGT ATT TTT C	3067-3091	
		Probe	CCG GAA GTT CCC GCT TAC AAC	3040-3062	
PV-B19 <i>genotype I</i>					
(modified from Liefeldt <i>et al.</i> J Med Virol 2005)	NS1	Forward	TCC CTG GAA TTA ATG CAG ATG C	1892-1913	M13178
		Reverse	CAC TGC TGC TGA TAC TGG TGT CT	1972-1950	
		Probe	ACC TCC AAA CCA CCC CAA TTG TCA CA	1925-1950	
PV-B19 <i>genotype II</i>					
(modified from Liefeldt <i>et al.</i> J Med Virol 2005)	NS1	Forward	TCC CTG GAA TTA ATG CAG ATG C	1833-1854	AJ717293
		Reverse	CAC TGC TGC TGA CAC TGG TGT CT	1913-1891	
		Probe	ACC TCC AAA CCGTCC CCA TTG TCGCA	1866-1891	
PV-B19 <i>genotype III</i>					
(modified from Liefeldt <i>et al.</i> J Med Virol 2005)	NS1	Forward	TCC CTG GAA TTA ATG CAG ATG C	1784-1805	AX003421
		Reverse	CAC TGC TGC TGC TAC TGG TGT CT	1864-1842	
		Probe	ATC TCC AAA CCA CCC CCA TTG TCC CA	1817-1842	

Preparazione curva standard

Per la costruzione della curva standard per la quantificazione assoluta dei genomi virali identificati è indispensabile aver a disposizione un elevato numero di copie della sequenza di DNA di interesse per procedere, poi al sub-clonaggio in un plasmide del tipo “TA-cloning”. È per questo motivo che i prodotti delle PCR specifiche per le sequenze virali in esame sono stati subclonati nel plasmide pGEM®-T Easy (Promega) (Figura 13).

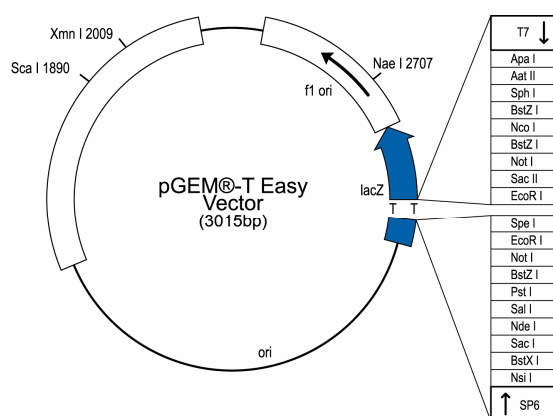


Figura 53. Rappresentazione del plasmide del tipo “TA-cloning “ pGEM® T Easy.

Il sistema impiega un vettore disegnato con una coda di timidine in 3' che possono appaiare con la coda poly-A generata dalla Taq polimerasi nei prodotti di PCR. Il sito di multi clonaggio (MCS) del pGEM®-T Easy è contenuto in una regione che codifica per la proteina batterica β-galattosidasi, un enzima in grado di trasformare un prodotto come X-Gal in un metabolita cromogeno: se si ottiene l' inserzione del prodotto di PCR si produce una mutazione inserzionale nella cornice di lettura del gene Lac-Z. Dopo la trasformazione, le colonie delle cellule batteriche che hanno internalizzato il plasmide con l'inserto non saranno più in grado di trascrivere il gene LacZ e, se piastrate in presenza di X-Gal, cresceranno bianche o, nel caso di una espressione residua del gene, azzurre. Il vettore possiede dei siti di restrizione unici che consentono il rilascio dell'inserto.

La ligazione del prodotto di PCR è stata eseguita come indicato nel protocollo del kit pGEM®-T Easy (Promega) utilizzando circa 30 ng del prodotto di amplificazione per le diverse sequenze virale caratteristiche dei singolo virus ricercati. Di seguito, è stata eseguita una trasformazione per shock termico, incubando 50 µl di cellule termocompetenti DH5α di E. coli e i 10 µl totali del prodotto di ligazione. Sono stati piastrati 30 µl della trasformazione su LB agar addizionato ad ampicillina, antibiotico di selezione, alla concentrazione di 100 µg/ml e trattato con X-Gal .

Le piastre sono state incubate a 37°C per 16 ore e il giorno seguente si sono selezionate le colonie bianche, inoculate per minipreparazioni in LB più ampicillina (100 µl/ml) e lasciate crescere a 37°C in agitazione per poter estrarre con minipreparazione il DNA plasmidico. Per verificare la presenza della sequenza virale desiderata all'interno del plasmide è stata condotta una reazione di PCR a partire da diluizioni di 10³ e 10⁶ del DNA ottenute dalla minipreparazione ed è stata condotta la reazione utilizzando gli stessi primers per il genoma virale analizzato. Una volta verificata la corretta inserzione, il clone batterico corretto è stato inoculato in terreno di coltura LB addizionato con ampicillina 100 µl/ml e lasciato crescere a 37°C in agitazione per 16 ore per estrazione di DNA plasmidico con il protocollo di midipreparazione, al fine di un DNA plasmidico ricombinante ad una maggiore concentrazione e purezza. Determinata la concentrazione del DNA plasmidico estratto, sono state preparate le diluizioni della curva standard: per la reazione di real-time PCR sono state utilizzate diluizioni scalari da 10⁶ a 10¹ copie/ml di plasmide.

2.3.1.3. Ricerca delle sequenze genomiche dei nuovi poliomavirus.

A) Ricerca delle sequenze genomiche del WU virus (WUV):

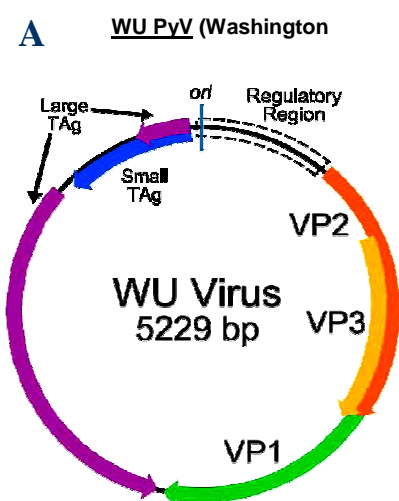
Il sistema con cui sono state ricercate le sequenze virali per il poliomavirus WU, è basato su un sistema di quantificazione assoluta in real time PCR. Sono stati impiegati primers e sonda riportati nel lavoro di Le B-M et al., (Emerging Infectious Diseases, Dec 2007) e di seguito riportate, che identificano una porzione di 91 bp, specifica della proteina VP1 del virus.

WU-TAB02-Fw 5'- TGGTGCATCCATTTGTTACATTCAT-3'

WU-TAB03-Rw5'- GAAAGAAGCTGTTAGACAAATATATAGGCCTTA-3'

WU-TAB04-probe 5'-FAM_ATGTCAGCAAATTC-3'_GBNFQ

Come controllo positivo e come plasmide da utilizzare nella costruzione della curva standard, è stato impiegato AP-p003 (Figura 14), gentilmente fornito dalla Professoressa Anne M Gaynor, dell'Università di Washington, che collabora con il gruppo del Prof. David Wang, il quale ha per primo identificato il WUV. Si tratta di un vettore per TA cloning pCR4.0 (Invitrogen) in cui è stata subclonata la sequenza di DNA genomico del WUV, pari a 228bp, corrispondente ad una porzione della proteina virale VP1.



B AP-p003

```

cctgtgcttaatgctggcactactactacaggggtgtaggaggtattgctggcccaacttattttgggcagttgg
aggacagcccttgatgtgctagacttctcccactgaaaaatacaagggcgctcagatactgtaaaccttaa
aaccaatggactgtgacctcatgtttattccagttctgaacacccagggaagggctcactaatgaaaagtacagcatt
gaatcatgggtggcagaccctagccgcaatgataactgcagatacttggcagaatggttggaggggctgcaactc
caccagtggtgctatfagtaataatagcacaattccactgttgatgaaaatggcattggcattcttctgcttcaaggta
gattgtacataactgtgctgacctttgggagtaacaaaatagagtacatacagggttccagatttttaggtac
actttagacaaagaagggttagaaaccatataataaattgctttataagcaggtgttaataagccagctgatgac
attagtgggcaactgcaggttacagaggttactatgactgaagaacagggcccttgcctcccacagtagaggaa
atggtggtgaccacaaccagtaattgtctcatttgcctgcaactgtaactttacaagccacaggcccaactaataac
acacaaggataatgtaataatgcagtttataataaagcaatttaagcattgtgtttcaagtagtggcatccattgtt
acattcatttgcatgtcagcaaatcagtaaggcctatatatttgcctaacagttcttccaatacacaactttagctgt
atacatgggtgaaaactactaacaggcctgcaccatattaacataattaaaatacacattccactttgtaaaccttttta
ccattggttggagttttatccagaactttctttaaagtgtctttgggtgtaaaaagtaeagttttatgaatctaggagca
aagtagcagggactaaatattcattcattgtacaatacctggaggaaaaattgtgacctttatttaaatgttttttcta
aattaacttaacattccatctaaatagctcttaaattatctaaagtactcattccattccagatgtaacagttattatct
cctactgacctttfacatctcaaaactactgtaaaattgatctattgcaactcctaactcaagtttaactctacagctgga
atattaatattaagccttctccacaaggtcaagtaagcagcaacagttgtttaccactgtttataggcccc
ttaaaaacccaataccttttttaggtacatttcaactataacttttaggtacctgtatacaagctcatctatttaccattag
gcctaaataccaggtacaccgcatataataaaacatctgtcacccttaatagtttatccattttgtccagattttt
ttcaatctctagctaataatctctctggacataattaaactatctacccttcttttgcataaccacatcaatagcctgt
tgacacacatttttactttactgtctgaaaatagtaagcattttttgatgtccatataagctattatgattgcatc
ttcattactattgcattttcacactctctaccttaatagatggtgtaataataccaagtaataagtacacatcatcaatt
cctaattcaaaagcaaatctgacaaaagcctccaatttaattgatctttaaactccccatataaatcctcagctttaaactc
atcttcttaagccaccaggatattttctcacataaaagtaaatggatctctagctactactataaacatagcatt
attaacacctttacaaaataaaaagctaatagtacagatccctacaaaagttattaacagcactaacctctatgtctaaa
agggttaaaaataaacacaagtgcagattataaagaatgtctacttgcaaaattacattaaacttactaaaagtttt
tatatagggttctgcttttcttgggtgtatgtattacaatgcagttaaagttctattactaaatacagctgagacaca

```

Figura 14. A. Rappresentazione della struttura genomica del poliomavirus WU. B. Sequenza dell'inserto di WU (2056-4283) 2228bp clonata all'interno del pCR4.0 (Invitrogen) impiegato come controllo positivo (AP-p003).

La quantificazione assoluta è stata condotta confrontando la quantità ottenute nei campioni positivi in esame, con quella delle diluizioni seriali della curva standard ottenuta mediante l'amplificazione della corrispondente sequenza di DNA genomico subclonata nel plasmide AP-p003. Il numero di copie genomiche virali, presenti nei campioni positivi, è stato calcolato automaticamente per mezzo del software 7900 ABI PRISM SDS software.

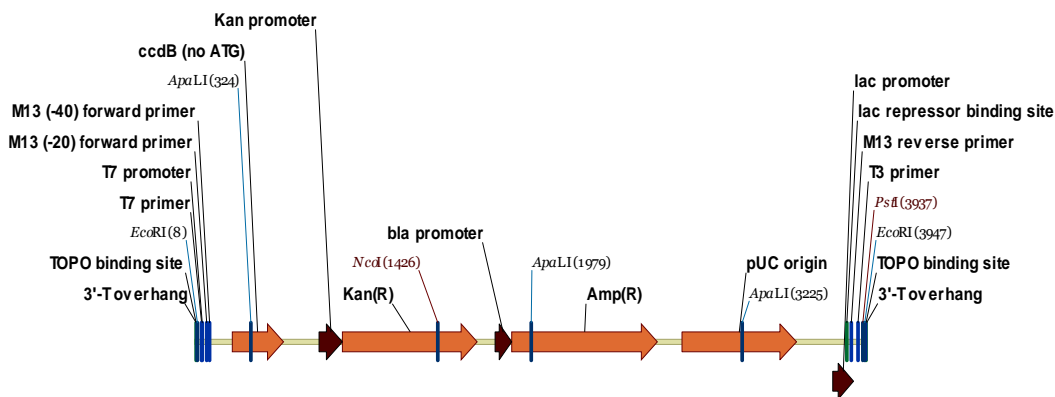


Figura 15. Rappresentazione grafica del plasmide pCR4.0 utilizzato per il clonaggio della sequenza genomica virale del WUV, AP-p003

B) Ricerca delle sequenze genomiche del KI virus (KIV):

Il metodo con cui sono state ricercate le sequenze virali per il poliomavirus KI, è basato su un sistema di quantificazione assoluta in real time PCR. Sono stati impiegati primers riportati nel lavoro di Bialasiewicz S et al., (Journal of Clinical Virology, 2007) e di seguito riportati, e la sonda n°53 del sistema UPL Roche che identificano una porzione di 114 bp, specifica della regione regolatoria del genoma virale.

KI_Fw: 5' -GAATGCATTGGCATTCTGTA-3'

KI_Rw: 5' -GCTGCAATAAGTTTAGATTGGTGC-3'

KI_probe_UPL: 5'-CTCTGCCA-3'

Il controllo positivo, pGEM-KIPyVP1-2 (5396 bp), è stato gentilmente fornito dal Professor Tobias Allander, della Karolinska University Hospital, il quale ha per primo identificato il KIV. Si tratta della sequenza di DNA genomico del KIV corrispondente a più porzioni delle proteine VP1, VP2 e VP3 subclonate nel sistema del vettore per TA cloning pGEM-T Easy Vector (Promega). La quantificazione assoluta è stata condotta confrontando la quantità ottenute nei campioni positivi in esame, con quella delle diluizioni seriali della curva standard ottenuta mediante l'amplificazione del plasmide controllo positivo pGEM-KIPyVP1-2. Il numero di copie genomiche virali, presenti nei campioni positivi, è stato calcolato automaticamente per mezzo del software 7900 ABI PRISM SDS software

2.3.2. Tipizzazione virale dei campioni positivi per il parvovirus B19.

Al fine di identificare ulteriori campioni positivi per le sequenze genomiche di B10 che potevano essere sfuggiti all'indagine condotta con il sistema specifico per il genotipo I del virus, tutti i DNA purificati dai diversi campioni biologici e per i diversi tempi del follow-up, sono stati sottoposti ad un diverso protocollo di real time PCR che utilizza primers specifici per tutti e tre i genotipi di B19 (*vedi* Tabella primers e sonde) e successivamente sequenziati al fine di confermare il genotipo virale identificato mediante sequenziamento automatico, basato sul metodo di Sanger o sequenziamento a termine di catena.

2.3.2.1. Protocollo di sequenziamento automatico.

Prima di essere sottoposti a sequenziamento, gli amplificati devono essere purificati e liberati da dNTPs non incorporati e da eventuali dimeri di primer. Sono state impiegate a tale scopo le colonnine Microcon 100 (Micon®). È stata stimata la quantità di prodotto di PCR ottenuto mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% di 5 µl dell'amplificato purificato, in parallelo all'appropriato marker di peso molecolare (DNA Molecular Weight Marker VIII,

Roche). Circa 100 femtomoli di amplificato sono state impiegate per la reazione di sequenziamento, eseguita in un volume finale di 10 µl e contenente, oltre all'amplificato, Big Dye Terminator 1 µl (Applied Biosystems); Buffer 5x 1.5 µl; uno dei primer 1 µM, senso o antisenso, e acqua fino a volume finale). La miscela di Big Dye Terminator contiene DNA polimerasi, deossiribonucleotidi e dideossiribonucleosidi marcati con fluorocromi nelle proporzioni adeguate. Le condizioni di reazione per attuare il sequenziamento consistono in 32 cicli composti da tre fasi: denaturazione a 96°C per 10 secondi, appaiamento a 50°C per 5 secondi, estensione a 60°C per 4 minuti. Prima di sottoporre i campioni alla lettura al sequenziatore automatico, i prodotti di estensione devono essere purificati dall'eccesso di primer e nucleotidi non incorporati. La purificazione è stata eseguita mediante precipitazione con 1/10 di volume di sodio acetato 3M (pH 5.5) e 2 volumi di etanolo 96%, seguita da un lavaggio con etanolo 70%. Il DNA è stato quindi risospeso in 15 µl di formamide e sottoposto a denaturazione a 96 °C per 2 minuti. L'elettroforesi di sequenza è stata effettuata in sequenziatore capillare automatico ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) e l'analisi dei risultati è stata eseguita impiegando il programma di analisi della sequenza Chromas (Technelysium).

2.3.3. Valutazione dei trascritti virali di B19 nelle biopsie di rene.

A) Estrazione di RNA totale.

L'RNA totale è stato estratto da 10 biopsie di tessuto renale mediante l'utilizzo di colonne ad alta affinità costituite da un gel di silice, RNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) e successivamente trattato DNaseI (DNA-free, Ambion) secondo le indicazioni del prodotto al fine di eliminare eventuali tracce di DNA genomico contaminante. Infine, l'RNA è stato eluito in 30 µl di acqua addizionata con dietilpirocarbonato (DEPC), un inibitore delle RNAsi cellulari. L'RNA totale, dopo essere stato quantificato mediante lettura della densità ottica allo spettrofotometro (NanoDrop ND-1000) e valutato qualitativamente per essere certi che non fosse stato degradato nella fase di estrazione (RNA 6000 Nano LabChip® Kit e 2100 Bioanalyzer; Agilent), è stato conservato a -80°C.

B) Retrotrascrizione dell'RNA totale.

Sempre lo stesso quantitativo di RNA totale, circa 200ng/biopsia, sono stati retrotrascritti in cDNA in un volume finale di reazione di 30 µl utilizzando la trascrittasi inversa (RT) SuperScript II (Invitrogen, Live technologies) seguendo il protocollo indicato dal prodotto. Il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione è stato sottoposto a RT-PCR Real-Time.

C) RT- PCR Real time.

3 µl del prodotto di RT sono stati impiegati per ricercare i trascritti virali del B19: in particolari sono state effettuate RT-PCR real time per la ricerca dei geni strutturali tardivi VP1 e VP2 utilizzando la combinazione dei primers H6/7 e H6+ e H6- come riportato nella figura 16. Tale sequenze nucleotidiche sono situate in porzioni non contigue del genoma virale in modo da amplificare preferenzialmente le diverse forme di splicing dei suddetti trascritti (Bonvicini et al. Virology 2006).

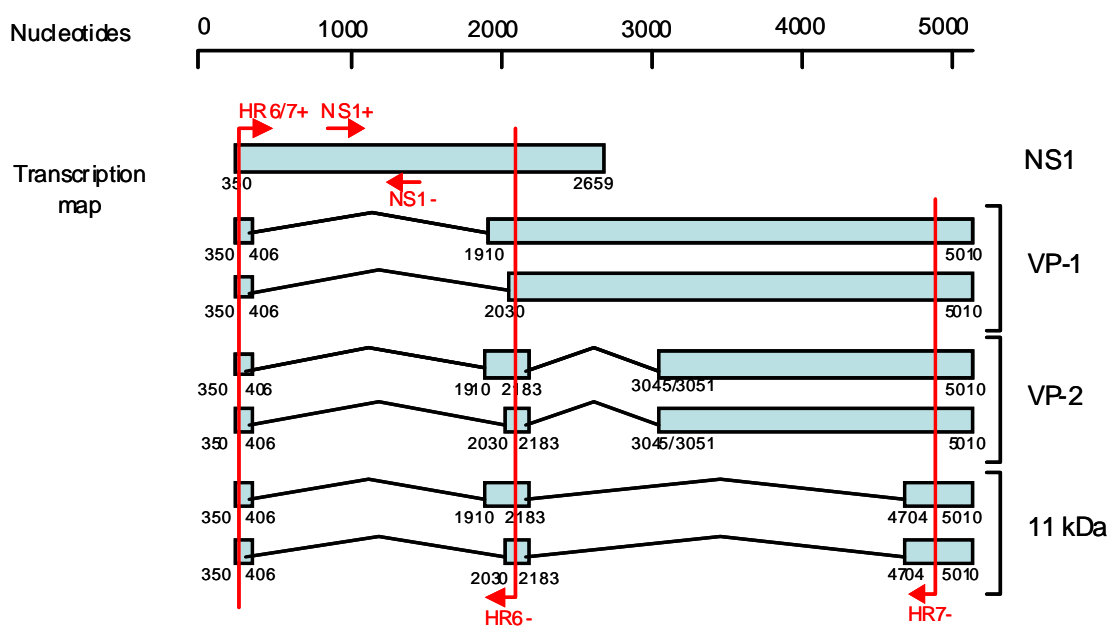


Figure 16. Mappa rappresentante i trascritti virali di B19. Nella mappa vengono indicati: le sequenze di RNA, le giunzioni di splicing, i prodotti proteici risultanti NS1, VP-1, VP-2, e 11 kDa oltre alla posizione dei primers H6+/6- e H6+/7- utilizzati nell'analisi di RT-PCR per lo studio dei trascritti virali.

Mentre per l'analisi del gene virale non strutturale NS1, sono stati utilizzati i primers PV-B19 genotipo I oppure II mostrati nella tabella Primers e Sonde. Nel dettaglio, 3 µl di cDNA sono stati mescolati con 12.5 µl di una Mastermix Universale per "Taq-Man" 2X (Applied Biosystems), con ciascun primer specifico senso e antisenso 10µM ciascuno (Invitrogen) e con la sonda fluorogenica specifica 5 µM (Invitrogen), quindi il volume finale di reazione è stato portato a 25 µl mediante aggiunta di acqua.

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate nell'apposito termociclatore (ABI PRISM 7700; Applied Biosystems) secondo il seguente profilo termico:

50°C per 2 minuti, 95°C per 10 minuti, seguiti da

45 cicli costituiti da 15 secondi a 95°C ed 1 minuto a 60°C.

I vari prodotti delle reazioni di RT-PCR Real time sono stati valutati nelle loro lunghezze mediante corsa elettroforetica su chip specifici per DNA (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies).

A causa della possibile variabilità associata alla fase di estrazione dell'RNA dalle cellule, è stata eseguita una reazione di RT-PCR Real time per il gene *housekeeping* della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi umano (hGAPDH) che è espresso in modo costitutivo nell'ambito di uno stesso tipo cellulare.

Tutti i prodotti di RT-PCR positivi sono stati confermati in qualità di trascritti virali del parvovirus B19 anche mediante sequenziamento automatico (*Vedi paragrafo 2.3.3.1.*).

2.3.4. Analisi dello stato sierologico del donatore e del ricevente (D/R).

È stata studiata la condizione sierologica del donatore e del rispettivo ricevente (D/R) al momento del trapianto e per i vari momenti del follow-up clinico relativa ai virus HCMV, EBV, B19. Tutte le indagini sierologiche sono state effettuate secondo i protocolli impiegati presso l'UOC Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

In particolare gli anticorpi IgM e IgG contro HCMV sono stati studiati con il kit ELISA commerciale (enzyme-linked immunosorbent assay) Enzygnost CMV (Dade Behring); la ricerca degli anticorpi anti-EBV-VCA e delle IgG contro EBV-EA, EBV-VCA, e EBV-EBNA è stata condotta mediante il kit ELISA della ditta DiaSorin SpA. La sierologia per il parvovirus B19, IgM e IgG, è stata studiata attraverso il kit EIA commerciale della ditta Biotrin.

2.3.5. Valutazione clinica della funzionalità renale.

Per ogni tempo in cui è stata effettuata la biopsia del rene prima e dopo il trapianto sono stati raccolti anche i dati relativi a dei test che permettono di valutare la funzionalità renale. Più precisamente sono state valutate retrospettivamente i valori di clearance della creatinina e la proteinuria.

Per clearance (depurazione) della creatinina s'intende la quantità di sangue che viene depurata da tale sostanza nell'unità di tempo (1 minuto), per opera del rene. Di conseguenza, per determinare la clearance della creatinina è necessario eseguire una raccolta delle urine nelle 24 ore, valutando poi la creatininuria (concentrazione di creatinina nelle urine) e la creatininemia (concentrazione di creatinina nel plasma). I dati raccolti sono stati valutati con la formula di Swartz.

Mentre per proteinuria è la presenza di proteine nell'urina come risultato della scarsa funzionalità dell'apparato di filtrazione del rene stesso che non è più in grado di trattenerle, consentendone la perdita nelle urine. La proteinuria viene rivelata da un esame delle urine.

2.3.6. *Analisi statistica dei dati.*

I dati sono espressi come media \pm deviazione standard, oppure come mediana e range. Le variabili continue con una normale distribuzione sono state analizzate con il test del t-student mentre i dati con una distribuzione non normale sono stati analizzati con il Wilcoxon rank-sum test. Le variabili categoriche sono state analizzate con il test Chi quadrato. Il rischio cumulativo di infezione virale o di comparsa di lesioni nel rene trapiantato è stata stimata con il metodo di Kaplan-Meier e confrontato tra i vari gruppi con test log-rank. E' stata eseguita analisi univariata e multivariata mediante regressione di Cox (o modello dei rischi proporzionali) per valutare le variabili associate con il rischio di comparsa di lesioni nel rene trapiantato. Tutti i confronti statistici sono stati condotti con test a due code, ed è stato considerato statisticamente significativo un valore di *P* inferiore a 0.05.

CAPITOLO 3

RISULTATI

3.1. Ricerca delle sequenze virali nelle biopsie del rene del donatore.

La ricerca del DNA virale nelle biopsie del rene del donatore permette sia di conoscere la prevalenza delle sequenze genomiche virali nel rene sano di individui giovani, come viene considerato il rene del donatore, sia di valutare il potenziale rischio di trasmissione dell'infezione virale dal donatore al ricevente. Il DNA estratto dalle biopsie del rene del donatore è stato utilizzato per identificare la presenza di sequenze genomiche degli herpesvirus HCMV, EBV, HHV6, HHV7, HHV8, HSV1 e HSV2, e VZV, dei poliomavirus BKV, JCV e del parvovirus B19 mediante real-time PCR quantitativa.

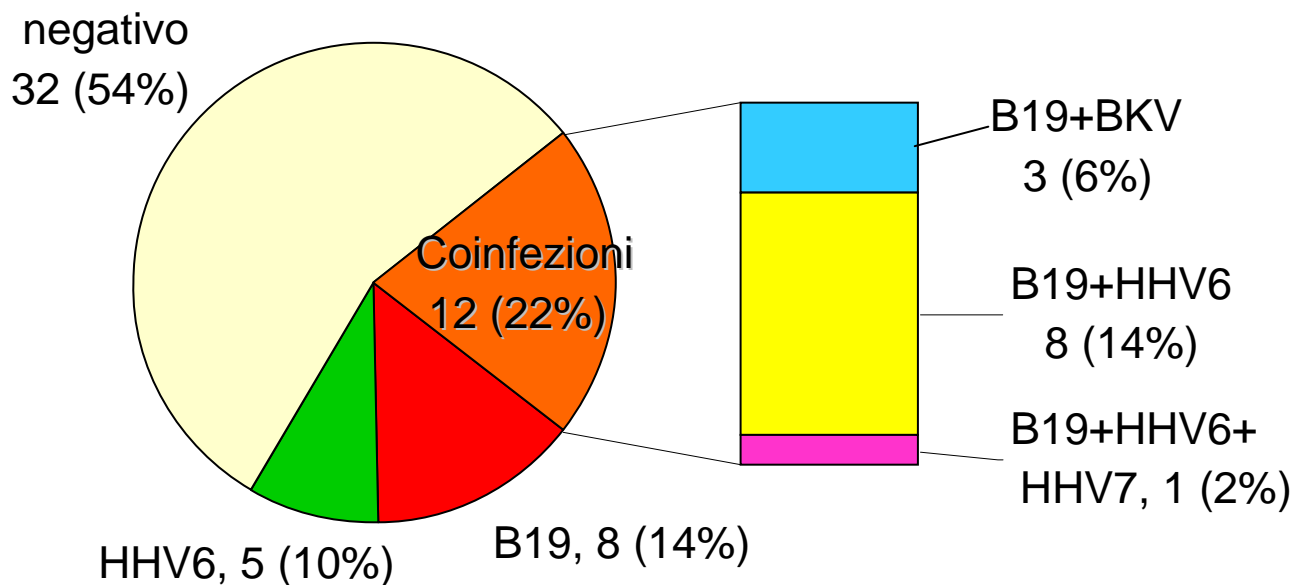


Figura 67. Identificazione dei genomi virali nelle 69 biopsie di rene di donatori

In generale il DNA virale è stato ritrovato nel 46% delle biopsie di rene del donatore ed in circa la metà dei casi, si trattava di infezione da almeno due diversi virus. La prevalenza del parvovirus B19 insieme all'herpesvirus HHV6 erano le più elevate: il parvovirus B19 era presente nel 35% dei reni del donatore e il DNA di HHV6 nel 25%. Questi due virus, oltre ad essere i più prevalenti, si presentavano spesso come sequenze virali coinfettanti il rene del donatore. Gli altri virus ricercati sono risultati raramente presenti nel rene del donatore, come

HHV7, riscontrato nel 2% dei casi, e BKV, presente nel 5% delle biopsie, oppure del tutto assenti, come HCMV o EBV (Tabella 1). Inoltre il DNA virale è stato ritrovato più frequentemente nei donatori con età superiore a 6 anni rispetto ai donatori più giovani (56% vs 9%; $P < 0.05$). Tutte le biopsie renali del donatore mostravano un quadro istologico normale.

3.2. Identificazione di sequenze virali intrarenali, rischio di rigetto renale acuto o cronico e funzione renale durante il follow-up.

Secondo il protocollo di follow-up, sono stati eseguiti controlli a 6, 12, e 24 mesi dal trapianto. I controlli comprendevano valutazione clinica, biopsia del rene trapiantato per esame istologico, esami ematochimici per valutare la funzione renale (proteinuria, *clearance* della creatinina), monitoraggio delle infezioni virali mediante test molecolari ed indagini sierologiche. La biopsia viene eseguita per poter stimare la situazione istologica del rene trapiantato secondo le indicazioni della classificazione di Banff. In questo modo è possibile osservare la comparsa di rigetti acuti, che presentano avvolte un quadro subclinico, e a valutare la comparsa di lesioni croniche del rene trapiantato.

Considerando l'insieme dei risultati dell'indagine virologica condotta su tutte le biopsie per tutti i momenti del follow-up, sequenze di DNA sono state riscontrate nel 70% dei casi, e nel 25% delle biopsie positive si trattava di infezione virale. Le sequenze genomiche dei virus B19, HHV-6, EBV e BKV erano riscontrate più frequentemente rispetto agli altri virus. In particolare, la prevalenza di EBV e BKV nelle biopsie renali aumentava con l'avanzare del follow-up post-trapianto (Tabella 1 e Figura 17).

Biopsie di follow-up			
	6 mesi (n = 69)	12 mesi (n = 64)	24 mesi (n = 45)
Q.S. virus	65%	69%	73%
Coinfezioni	26%	21%	27%
HCMV	3%	0	0
EBV	11%	12%	20%
HHV-6	25%	22%	23%
HHV-7	5%	3%	5%
HHV-8	2%	2%	2%
HSV-1	0	0	0
HSV-2	0	0	0
VZV	0	0	0
BKV	17%	24%	20%
JCV	2%	2%	2%
B19	31%	33%	32%

Tabella 2 Identificazione dei genomi virali nelle biopsie dei pazienti trapiantati di rene.

Le sequenze genomiche virali di HCMV, HHV-7, HHV-8 e JCV sono state ritrovate in una bassa percentuale di casi, mentre i virus HSV-1, HSV-2, e VZV non sono mai stati identificati (Tabella 1).

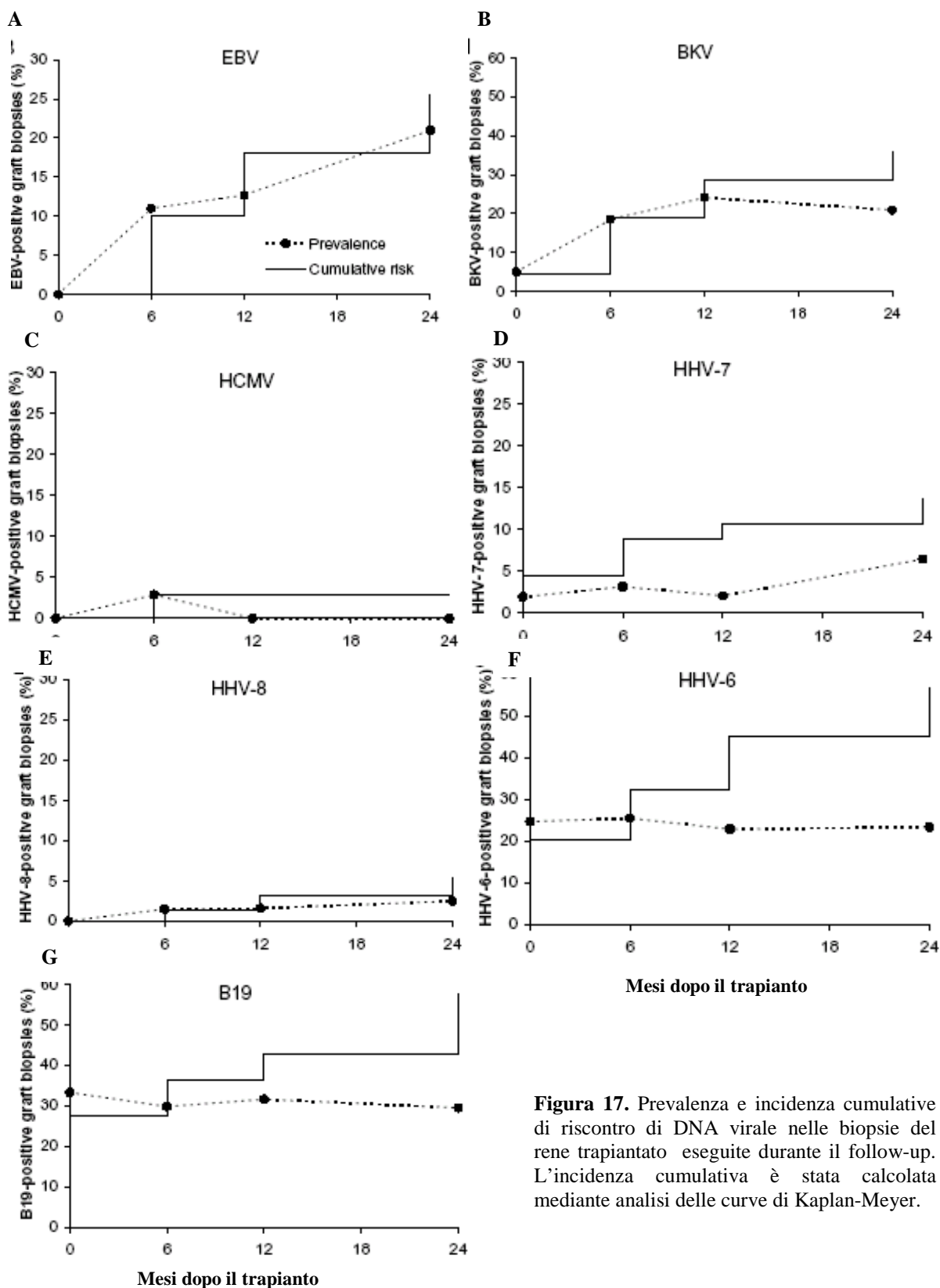


Figura 17. Prevalenza e incidenza cumulativa di riscontro di DNA virale nelle biopsie del rene trapiantato eseguite durante il follow-up. L'incidenza cumulativa è stata calcolata mediante analisi delle curve di Kaplan-Meier.

I campioni risultati positivi per la ricerca di parvovirus B19 sono stati genotipizzati mediante real time PCR con primers e sonde specifiche per i genotipi I, II, III. Le sequenze nucleotidiche dei relativi primers e sonde impiegate sono stati pubblicati da *Liefeldt et al. J Med Virol* 2005 e da noi modificate per migliorarne la sensibilità (vedi *Tabella "primers e sonde"*). Lo studio di genotipizzazione ha dimostrato la presenza di B19 di genotipo 1 in tutti i casi, eccetto un caso in cui il ricevente mostrava un positività per il genotipo 2 di B19, confermato in due tempi successivi del follow-up.

Dal momento che la ricerca delle sequenze genomiche virali è stata condotta mediante real-time PCR quantitativa, è possibile definire anche il numero di copie genomiche virali presenti in ciascun campione positivo. Infatti è stato calcolato che nelle biopsie positive per la presenza di DNA virale di BKV, HHV-6 e B19 il numero medio di copie genomiche virali era 7 copie/1000 cellule, fino ad un massimo di 3000 copie/cellula nel caso del poliomavirus BKV, di 25 copie/cellula per B19 e di 140 copie/cellula per HHV6. Per quanto riguarda EBV, il titolo virale, sempre calcolato mediante real-time PCR quantitativa, risulta piuttosto basso: in media 0.2 copie di DNA virale/1.000 cellule.

Dall'indagine istologica condotta su tutte le biopsie effettuate secondo il protocollo di follow-up, è stato osservato che già a 6 mesi dal trapianto in circa il 37% delle biopsie era osservata la presenza di lesioni di diverso tipo e grado. La prevalenza e il rischio cumulativo della presenza di lesioni croniche è risultato aumentare con il passare del tempo dopo il trapianto e circa il 70% dei pazienti trapiantati mostravano cambiamenti riconducibili a patologie croniche del rene nell'arco dei 24 mesi post-trapianto (Tabella 2 e Figura 18).

	Baseline	Follow-up		
	(n = 57)	6 months (n = 69)	12 months (n = 64)	24 months (n = 45)
<i>Histological analysis of the kidney allograft*</i>				
Normal histology	100%	63%	53%	36%
Acute rejection	0	12%	9%	5%
Chronic injury	0	25%	38%	59%

Tabella 3. Dati relativi all'analisi istologica delle biopsie baseline e di follow-up.

Per quanto concerne la prevalenza dei casi di rigetto acuto invece risultano diminuire con il passare del tempo dal momento del trapianto (Tabella 2 e Figura 18).

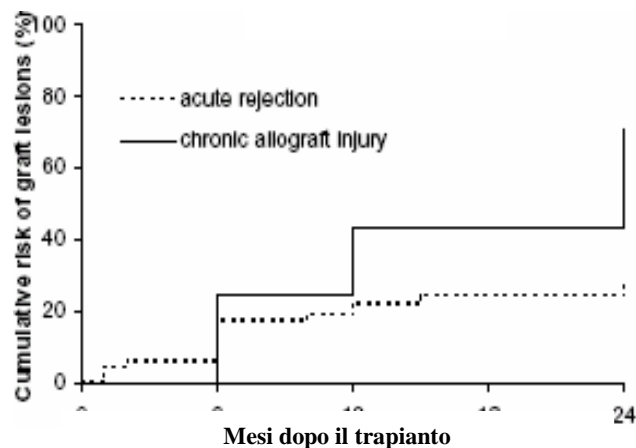


Figura 18. Incidenza cumulativa di lesioni istologiche nelle biopsie del rene trapiantato eseguite durante il follow-up. L'incidenza cumulativa è stata calcolata mediante analisi delle curve di Kaplan-Meyer.

Analizzando le possibili associazioni tra la presenza delle sequenze genomiche virali a livello delle biopsie renali di follow-up e il corrispondente quadro istologico è stato possibile concludere che la presenza di un qualsiasi DNA virale è più frequente in quelle biopsie che mostrano lesioni croniche rispetto a quelle che invece hanno un'istologia normale o caratteristiche di rigetto acuto (rispettivamente 79.4% vs 61.4% vs 56.6%), anche se la differenza non risultava essere statisticamente significativa. Non è stata invece osservata un'associazione significativa tra titolo virale e presenza o gravità delle lesioni del rene trapiantato rilevate con l'indagine istologica.

Inoltre, la valutazione istologica delle 9 biopsie effettuate a scopo diagnostico, ha mostrato la presenza di:

- 4 casi di rigetto acuto mediato da cellule T, uno dei quali risultava positivo per il DNA di HHV6;
- 1 caso di rigetto acuto anticorpo mediato C4d positivo associato alla presenza del DNA del parvovirus B19;
- 2 casi di nefropatia associata all'infezione da BKV;
- 1 caso di microangiopatia trombotica associata alla presenza del parvovirus B19 e positivo per il DNA virale;
- 1 caso con istologia normale.

Nei 2 casi di nefropatia associata al poliomavirus BKV, il DNA virale è stato identificato per la prima volta nella biopsia diagnostica, mentre in tutti gli altri casi in cui le biopsie diagnostiche sono risultate positive per la presenza di DNA virale, i virus erano già presenti nelle precedenti biopsie di follow-up.

Dall'analisi dei dati relativi alla proteinuria e alla clearance della creatinina durante i vari tempi del follow-up è emerso che la funzionalità renale è rimasta stabile nel medio e lungo periodo post trapianto in quasi tutti i pazienti (Tabella 3).

	Baseline	Follow-up		
	(n = 57)	6 months (n = 69)	12 months (n = 64)	24 months (n = 45)
<i>Renal function tests</i>				
Creatinine clearance (ml/min/1.73 m ²)	NA	64.31 ± 21.08	61.33 ± 19.26	61.60 ± 21.65
Proteinuria (g/L)	NA	0.168 ± 0.279	0.121 ± 0.215	0.093 ± 0.176

Tabella 4. Dati relativi alla valutazione delle funzionalità renali durante il protocollo di follow-up.

L'analisi delle possibili correlazioni tra la presenza di sequenze genomiche virali nel rene trapiantato e i risultati dei test di funzionalità renale effettuati nello stesso momento del follow-up ha permesso di osservare che solo nel caso del parvovirus B19 i pazienti con biopsie positive per il DNA virale avevano livelli di proteinuria significativamente più elevati rispetto ai pazienti che avevano biopsie negative per il virus (rispettivamente 0.219 ± 0.352 g/L vs 0.103 ± 0.166 g/L, $P < 0.05$).

3.3. Persistenza del DNA virale nelle biopsie di follow-up e rischio di sviluppare lesioni nel rene trapiantato.

Nel ricercare la presenza del DNA virale intra-renale dopo il trapianto, è stato valutato anche quante volte il dato positivo veniva confermato nei vari tempi del follow-up dello stesso paziente, considerando la presenza del virus essere *persistente* nel caso in cui almeno due biopsie consecutive del protocollo di follow-up risultavano positive per la presenza dello stesso virus. Il razionale di questo tipo di indagine nasce dal fatto che abbiamo ipotizzato che la persistenza virale possa essere coinvolta nella comparsa di un danno, sia di tipo acuto che cronico, a carico del rene trapiantato. Infatti la lesione comparsa in seguito alla persistente presenza del virus nell'organo trapiantato potrebbe essere dovuta sia ad un'azione diretta da parte di qualche proteina virale (proteine di latenza o proteine strutturali del virus) oppure essere suscitata dalla risposta immunitaria costantemente stimolata dalla presenza del virus.

In seguito a questo tipo di indagine è emerso che i virus generalmente persistono nelle successive biopsie di follow-up. Questo è particolarmente vero per il parvovirus B19 e per HHV6, i quali persistono nel rene del ricevente rispettivamente nel 85% e nel 71% dei casi in cui era positiva la biopsie del donatore. Anche EBV e BKV, la cui presenza nel rene trapiantato si osservava dopo in trapianto, persistevano nel 71% e nel 68% dei casi, rispettivamente. In due pazienti è stata osservata la persistenza intrarenale dell'infezione da HHV-7 e JCV.

Confrontando i casi in cui le biopsie di follow-up mostravano persistenza dell'infezione virale con quelle che non la mostravano, i pazienti con persistenza virale intrarenale hanno:

- una clearance della creatinina minore (valore medio 56.82 ± 20.27 vs 65.41 ± 17.55 ml/min/1.73 m² a 12 mesi dopo il trapianto) che però non è statisticamente significativa ($P = 0.07$);
- livelli di proteinuria più elevati (valori medi 0.158 ± 0.238 g/L vs 0.035 ± 0.052 a 12 mesi dopo il trapianto), con una differenza tra i due gruppi statisticamente significativa ($P < 0.01$).

Se si considera la persistenza intrarenale dei singoli virus, i pazienti con infezioni persistenti da B19 avevano un più elevato livello di proteinuria rispetto ai pazienti in cui non era dimostrata la persistenza del DNA del parvovirus B19; i rispettivi valori medi di proteinuria nei due gruppi di pazienti sono i seguenti: 0.317 ± 0.342 g/L vs 0.119 ± 0.09 g/L a 12 mesi dal trapianto, la differenza risulta statisticamente significativa ($P < 0.05$). Per verificare l'ipotesi che la persistenza virale intrarenale possa essere coinvolta nell'insorgenza delle lesioni nel rene dopo il trapianto, è stata condotta eseguita analisi delle curve di Kaplan-Meier e il test log-rank, che ha dimostrato che la persistenza dell'infezione virale è associata allo sviluppo di lesioni croniche (hazard ratio, 1.87; CI 95%, 1.19-3.43; $P < 0.01$). Considerando l'analisi condotta per la persistenza dei singoli virus, nel caso del parvovirus B19, la persistenza del DNA virale nelle biopsie era significativamente associata allo sviluppo di lesioni croniche nel rene trapiantato (hazard ratio, 1.71; CI 95%, 1.31- 3.60; $P < 0.05$; figure 19).

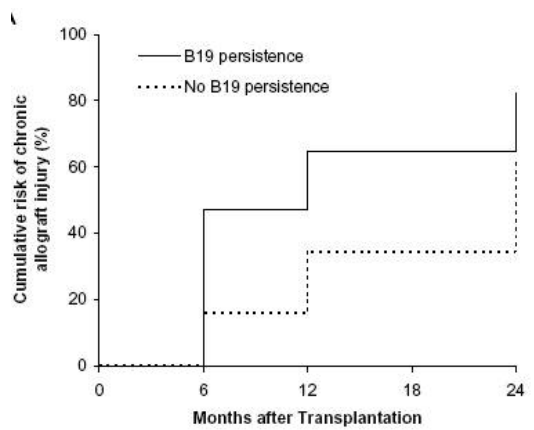


Figura 19. Rappresentazione dell'analisi con curve di Kaplan-Meier che dimostrano l'associazione tra persistenza intrarenale del DNA di B19 e rischi di sviluppare lesioni croniche del trapianto (log-rank, $P = 0.03$).

I risultati relativi all'associazione tra la persistenza di B19 e quadro istologico delle biopsie post-trapianto sono stati confermati mediante analisi multivariata con la regressione di COX (o modello dei rischi proporzionali) (Tabella 4). Il quadro istologico osservato nella biopsie con lesione cronica associata alla persistenza di B19 era caratterizzato dall'aumento della matrice (mm123), spesso accompagnato da sclerosi dei glomeruli e atrofia glomerulare (ct1, ct2), e fibrosi interstiziale (ci1, ci2) e oltre ad un ispessimento dell'intima delle arterie (cv1, cv2) (Figura 20).

Il tipo di regime immunosoppressivo impiegato nel trattamento post trapianto di rene non era associato con la presenza di DNA virale intrarenale tanto meno con la persistenza dell'infezione, con i vari tipi di danno renale, né con la funzionalità renale.

	Hazard ratio for acute rejection (95% CI)	P	Hazard ratio for chronic allograft injury (95% CI)	P
Identificazione di genomi virali persistenti nel rene trapiantato				
Q.S. virus	1.43 (0.46-4.42)	0.53	1.87 (1.19-3.43)	0.02*
EBV	2.85 (0.77-10.58)	0.11	0.98 (0.35-2.72)	0.96
HHV-6	1.10 (0.24-5.14)	0.89	1.08 (0.44-2.62)	0.83
BKV	0.59 (0.22-4.82)	0.97	1.44 (0.57-3.62)	0.29
B19	1.68 (0.60-4.71)	0.32	1.71 (1.31- 3.60)	0.04*

Tabella 4 Associazione tra l'infezione virale persistente ed il rischio di sviluppare lesioni acute e/o croniche del rene trapiantato durante il periodo di follow-up in 69 pazienti pediatriche trapiantate di rene (*P<0.05).

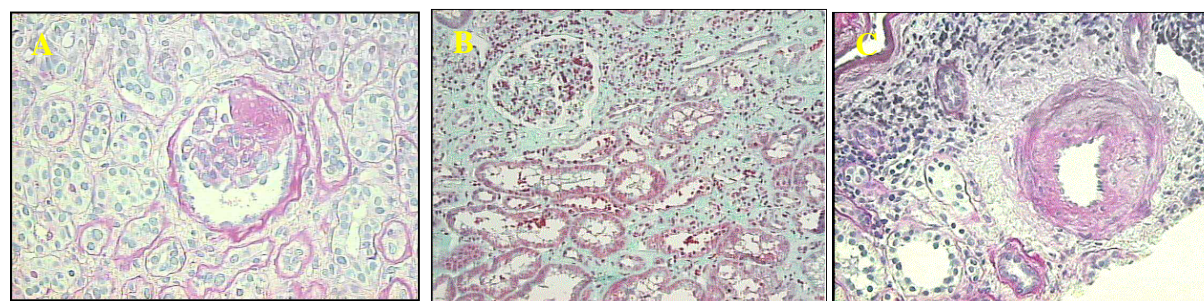


Figura 20. Lesioni istologiche croniche del trapianto di rene (Banff '97-'05): lesioni glomerulari (A), lesioni tubulointestiziali (B), e lesioni vascolari (C).

3.4. Ruolo del parvovirus B19 nell'infezione renale post trapianto: infezione persistente o litica?

Dalla precedente sessione dei risultati è emerso il significativo ruolo patogenetico dell'infezione da parvovirus B19 nella comparsa di lesioni nel rene del paziente pediatrico dopo il trapianto. Va comunque definito se tale virus può essere considerato il diretto responsabile dell'infezione del rene: è per questo che è importante studiarne gli eventuali meccanismi patogenetici che potrebbero spiegare l'associazione tra le principali infezioni virali e il conseguente lesione cronica nel rene trapiantato. A tal proposito, per valutare lo stato del parvovirus B19 nel rene trapiantato, è stata valutata l'espressione dei trascritti virali nelle biopsie renali di 10 pazienti positivi per il DNA di B19. Nei pazienti sieronegativi per B19 al momento del trapianto, che avevano ricevuto un organo B19 positivo, i quali hanno presentato un'infezione primaria con DNAemia, è stata dimostrata l'espressione dei geni litici virali, codificanti le proteine strutturali tardive (VP1, VP2) (figura 13 del capitolo 2). Nei riceventi sieropositivi non è stata dimostrata invece espressione intrarenale dei geni litici di B19, mentre la mancanza di siti di splicing nel trascritto del gene precoce *NS1* non consente di determinarne con sicurezza l'espressione. Mancano inoltre nel commercio anticorpi per lo studio dell'espressione della proteina NS1. I dati ottenuti ci permettono quindi di ipotizzare che le lesioni renali possano essere determinate dalla replicazione virale persistente come dimostrato dalla DNAemia prolungata e dall'espressione dei geni litici nel rene trapiantato. È ipotizzabile che anche la proteina virale NS1 sia espressa e che eserciti danno renale per la sua attività pro-apoptica (Moffatt *et al.*; J Virol 1998). I risultati dell'analisi di espressione in RT-PCR sono esemplificati nella figura 21, e presentano un esempio di infezione litica di B19 dimostrata allo studio della biopsia del paziente #1 (linee 2, 4, 5, 6): in questo paziente infatti è stato possibile rilevare sia la presenza dei trascritti virali per i geni litici (linea 4 e 5) che per i geni non strutturali (linea 6). Mentre la valutazione dei trascritti virali presenti nella biopsia del paziente #2 ci permettono di evidenziare l'espressione della sola proteina virale non strutturale, NS1, (linee 3, 7, 8, 9) che giustificerebbe la presenza di un virus persistente e/o in fase latente, ma non è esclusa la possibilità di amplificazione di DNA genomico virale presente come contaminante nell'RNA purificato dai campioni biopsici.

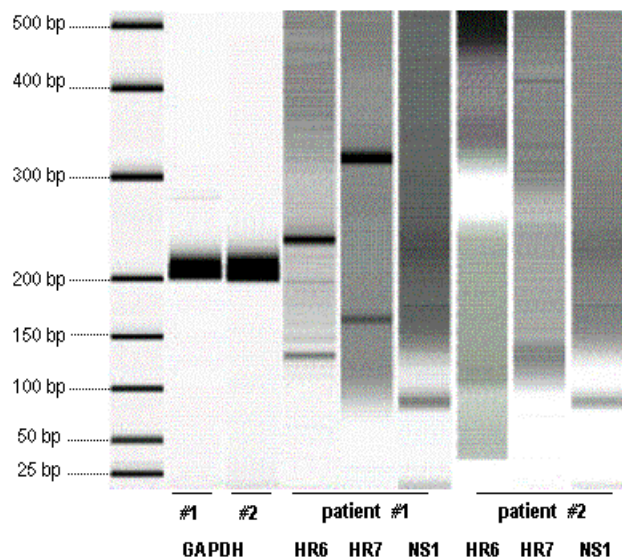


Figura 21. Risultato della valutazione dei trascritti virali con la metodica dell'RT-PCR e in seguito alla corsa elettroforetica dei relativi prodotti sullo strumento 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Linee 1: peso molecolare per DNA fornito dal Kit di analisi elettroforetica; Linee 2 e 3: risultati della reazione di RT-PCR per il gene housekeeping GAPDH; Linee 4 e 7: prodotti dell'RT-PCR ottenuta con la combinazione di primers HR6, che mostra 2 prodotti di amplificazione di 148 and 268 bp (base pairs, bp), corrispondenti alle varianti di splicing dei geni litici codificanti VP1, VP2, e la proteina di 11 kDa; Linee 5 e 8: prodotti dell'RT-PCR ottenuta con la combinazione dei primers H6+/7-, mostra gli amplificati di 325 e 181 bp, corrispondenti alle varianti di splicing del gene litico codificante per la proteina di 11 kDa; Linee 6 e 9: prodotti di RT-PCR di 74 bp, ottenuti dall'amplificazione del gene virale per la proteina NS1.

Successivamente l'identità dei prodotti di RT-PCR è stata confermata mediante sequenziamento automatico e la sequenza nucleotidica ottenuta è stata ricercata in BLAST (Figura 22 e 23) e confermata come sequenza appartenente al parvovirus B19 e alle relative sequenze geniche virali.

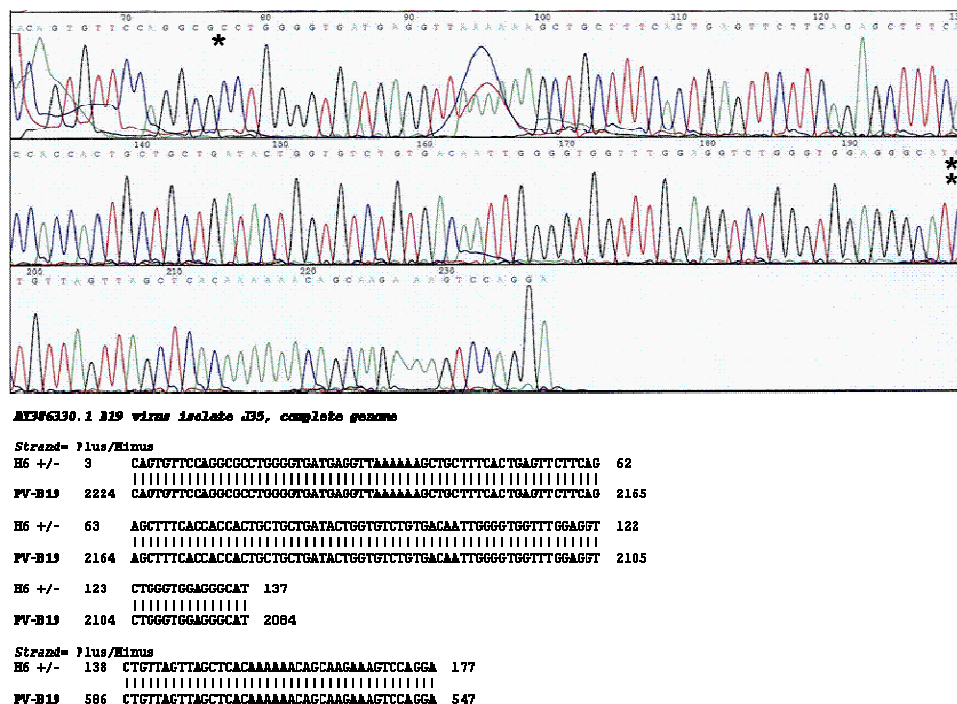
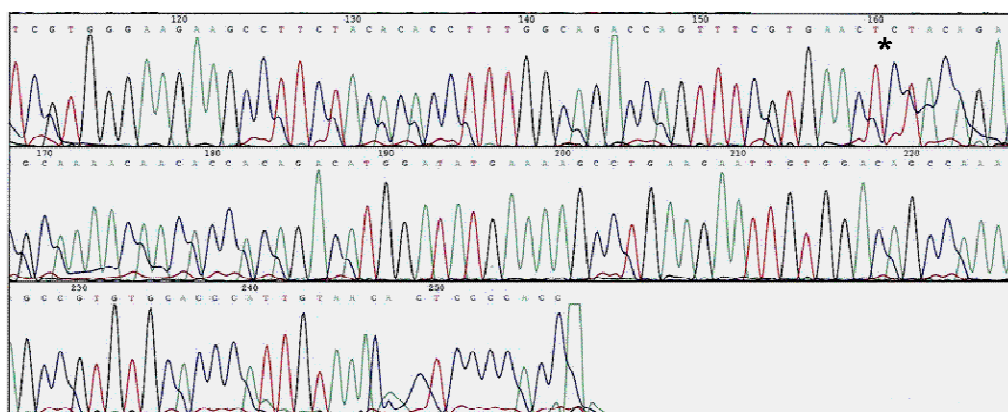


Figura 22. Analisi di sequenza degli ampliconi ottenuti dalla reazione di RT-PCR con la combinazione dei primers HR6. Nell'elettroferogramma (pannello in alto) sono mostrati, con degli asterischi, i siti di splicing. Mentre nell'allineamento in BLAST (pannello in basso) si può osservare che i siti di splicing cadono a livello dei nucleotidi 406-1910 (first splice acceptor (**)) e a livello della posizione 2030 (second splice acceptor (*)), rispetto alla mappa di trascrizione.



DP275151.1 Human parvovirus B19 IsoLalo

Seq#275151/p115		
HG +/-	11	CGCCCTGAAAGACTGAAACCCGCGCCCTGTAAGACGCGCAGCCCGGAGGCAAGTTCAAGCA 66
FF-B19	1631	CGCCCTGAAAGACTGAAACCCGCGCCCTGTAAGACGCGCAGCCCGGAGGCAAGTTCA-OGA 1669
H6 +/-	67	CGATCATTGTCGGAGCCGAGTTTCCTCGGAGTTGTAAGCTGCATCGTGGAGAGACCC 126
FF-B19	1630	CGATCATTGTCGGAGCCGAGTTTCCTCGGAGTTGTAAGCTGCATCGTGGAGAGACCC 1749
H6 +/-	127	TTTATATACCTTTTCAATATACCTTTTCAAT 161
FF-B19	1750	TTTATATACCTTTTCAATATACCTTTTCAAT 1794
H6 +/-	162	CTACACATCCAAACACACACACATCCATGTAAGCCCTGACATTTCCACAC 221
FF-B19	4305	CTACACATCCAAACACACACACATCCATGTAAGCCCTGACATTTCCACAC 4364
H6 +/-	222	CCAAAGCCGCTGTCAGCCATTTCCAGACTCCGACC 258
FF-B19	4365	CCAAAGCCGCTGTCAGCCATTTCCAGACTCCGACC 4402

Figura 23. Analisi di sequenza degli ampliconi ottenuti dalla reazione di RT-PCR con la combinazione dei primers HR7. L'elettroferogramma del filamento *senso*, mostrata nel pannello in alto, ha i siti di splicing indicati con un asterisco. Lo splicing (*) cade nella posizione 2183-4704 della mappa dei trascritti.

3.5. Identificazione delle sequenze virali intra-renali ed infezioni virali sistemiche.

Per ogni tempo del follow-up in cui sono state eseguite le biopsie, sono stati effettuati anche test di valutazione della quantità di DNA virale evidenziabile nei leucociti del sangue periferico o nel plasma, ovvero è stata analizzata la DNAemia virale come indice di possibili infezioni virali sistemiche in atto. E' stata inoltre correlata la DNAemia virale con la presenza delle sequenze genomiche virali intra-renali.

EBV: Durante i 24 mesi di follow-up, 34 pazienti hanno avuto episodi di DNAemia asintomatica da EBV: in 15 casi si trattava di infezione primaria da EBV e 19 casi di riattivazione del virus. In 3 pazienti si sono verificati casi di DNAemia sintomatica da EBV: in tutti e tre i casi si trattava di un' infezione primaria. La presenza delle sequenze genomiche di EBV nelle biopsie renali, dimostrate in 15 casi, erano sempre associate con DNAemia positiva ed erano più frequentemente osservate in situazioni di infezione primaria (in 11 pazienti) che nei casi di riattivazione dell'infezione nei riceventi sieropositivi per EBV (4 pazienti).

HCMV: Per quanto riguarda la DNAemia di HCMV, è stata osservata in 2 riceventi in forma sintomatica (un caso di infezione primaria e un caso di riattivazione virale) e in 14 pazienti in forma asintomatica. Tutti i casi di DNAemia associata alla presenza intrarenale del DNA di HCMV sono stati rilevati nei primi 6 mesi post trapianto (Figura 24). I 2 casi di biopsie positive per il DNA di HCMV erano anche positivi per la DNAemia virale, mentre tutti i casi di biopsie negative per le sequenze genomiche del HCMV mostravano nel contempo anche DNAemia negativa.

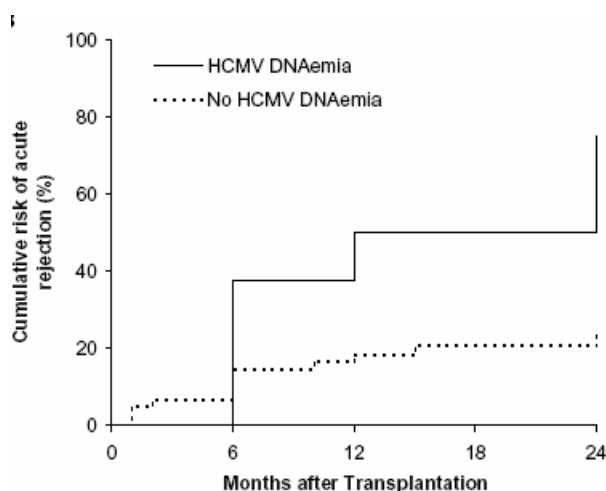


Figura 24. Curva di Kaplan-Meier che dimostra l'associazione tra episodi di HCMV-DNAemia e rischio di rigetto acuto (log-rank, $P = 0.006$).

BKV: In 8 pazienti è stata dimostrata la presenza di BKV-DNAemia, 6 dei quali presentavano un'infezione asintomatica mentre gli altri 2 riceventi presentavano DNAemia ad elevato titolo e nefropatia da BKV. Questi ultimi due pazienti hanno inoltre dimostrato insufficienza renale acuta a 10 e 15 mesi dal trapianto, rispettivamente. Inoltre, in entrambi questi riceventi, che hanno poi sviluppato lesioni croniche del rene, anche la biopsia renale del donatore e le biopsie di follow-up sono risultate positive per la presenza del BKV-DNA. Più in generale, tutti i pazienti che hanno presentato BKV-DNAemia avevano anche le biopsie effettuate nello stesso tempo del follow-up positive per il BKV-DNA, mentre il 30% dei casi di biopsie positive per il genoma virale non presentavano corrispondente DNAemia positiva.

Parvovirus B19: Episodi di B19-DNAemia sono stati osservati durante infezioni primarie in 9 riceventi sieronegativi per B19, 7 dei quali hanno successivamente presentato persistenza della B19-DNAemia durante il follow-up. In questi 7 casi la carica intrarenale di B19-DNA era elevata e il quadro istologico dimostrava rigetto acuto, seguito poi da gravi lesioni croniche. In 2 di questi pazienti la DNAemia era sintomatica: in un caso si è verificato un episodio di disfunzione acuta del rene trapiantato con diagnosi istologica di microangiopatia trombotica (Murer L. *et al.*, JASN 2000) e nell'altro caso, si è trattato di un rigetto acuto C4d-positivo, con

presenza di febbre, rash e anemia iporigenerativa nei primi mesi post-trapianto. Dall'analisi retrospettiva delle biopsie del rene del donatore e delle biopsie di follow-up è stato possibile dimostrare la presenza di B19-DNA in tutti i campioni. In 5 pazienti sieronegativi per B19, che hanno ricevuto un rene positivo per B19-DNA, non è stata rilevata DNAemia e tutti questi pazienti sono rimasti sieronegativi durante il follow-up nonostante il DNA virale fosse presente in maniera persistente nelle successive biopsie di follow-up. Il DNA di B19 era identificato in maniera persistente nel rene trapiantato anche in pazienti sieropositivi che avevano ricevuto un rene positivo per il DNA di B19, sebbene questi riceventi non mostrassero B19-DNAemia durante le successive valutazioni in corso di follow-up.

Complessivamente, i risultati dell'analisi della presenza del DNA virale intrarenale e dei corrispondenti dati di DNAemia indicano che EBV e HCMV, qualora rintracciati a livello renale, possano in realtà derivare dalle cellule circolanti del sangue periferico in corso di infezione sistemica o riattivazione virale, mentre BKV e parvovirus B19 sembrano avere tropismo renale dove sembrano essere in grado di persistere, anche in assenza di attiva replicazione.

E' stata eseguita analisi univariata e multivariata mediante la regressione di Cox per valutare se la DNAemia (sia sintomatica che asintomatica) era un fattore di rischio per il rigetto renale acuto e cronico. I risultati di questa analisi hanno dimostrato che episodi di HCMV-DNAemia erano fattori di rischio significativo per lo sviluppo di rigetto acuto del rene trapiantato, mentre gli episodi di B19-DNAemia si manifestavano più frequentemente, anche se in modo non statisticamente significativo, nei pazienti che in seguito hanno sviluppato rigetto cronico del rene trapiantato (Tabella 5).

	Hazard ratio for acute rejection (95% CI)	P	Hazard ratio for chronic allograft injury (95% CI)	P
<i>Infezione virale sistemica con DNAemia</i>				
Q.S. virus	0.85 (0.09-8.22)	0.89	1.34 (0.35-5.11)	0.67
EBV	1.65 (0.64-4.27)	0.29	0.59 (0.31-1.15)	0.12
HCMV	3.41 (1.03-11.28)	0.04*	1.22 (0.46-3.22)	0.67
BKV	0.49 (0.06-3.73)	0.48	0.61 (0.21-1.73)	0.35
B19	2.56 (0.79-8.21)	0.11	1.94 (0.91-4.15)	0.08

Tabella 5. Associazione tra l'infezione virale sistemica, al momento della biopsia di follow-up, e il rischio di sviluppare lesioni del rene trapiantato durante il periodo di follow-up in 69 pazienti pediatrici trapiantati di rene. (i dati sono espressi come media ± deviazione standard oppure mediana e range.

3.6. Approfondimento dell'indagine virologica del rene del donatore.

Il donatore di organo solido può rappresentare il principale veicolo di infezione virale del ricevente e quindi di insuccesso del trapianto a seguito di un rigetto e di un danno associato alla trasmissione del virus (Fishman JA *et al.*, N Engl J Med 2007). La questione assume un particolare significato nel paziente pediatrico dove si ha un sistema immunitario *naive* per numerose infezioni virali, che sono la principale causa di ospedalizzazione nei bambini. Inoltre, in questi pazienti, la comparsa delle infezioni virali avviene generalmente molto precocemente dopo il trapianto (2-4 settimane post-trapianto) e, in molti casi, sono dovute alla trasmissione del virus contenuto nell'organo trapiantato dove il virus può essere in latenza o in una precoce fase di infezione primaria non ancora identificata (Fishman JA *et al.*, N Engl J Med 2007). Dunque, migliorare la riuscita del trapianto aumentando la sorveglianza delle possibili infezioni trasmesse dal donatore è sicuramente uno degli aspetti presi in considerazione negli ultimi meeting sulla tematica dei trapianti di organo solido (es. il workshop del giugno 2005 “*Preventing Organ and Tissue Allograft-Transmitted Infection: Priorities for Public Health Intervention*” avvenuto negli US. Infatti lo screening dell'organo da trapiantare dovrebbe prevedere una revisione dell'epidemiologia delle infezioni emergenti e un'aggiornata applicazione delle tecnologie di laboratorio, in aggiunta alle indagini sierologiche già in uso, che consentano di migliorare l'indagine condotta a livello dell'organo da impiantare prevedendo così i potenziali rischi di danno dell'organo trapiantato (Fishman JA *et al.*, American Journal of Transplantation 2007).

Inoltre va precisato che la presenza del virus nell'organo del donatore dipende anche dal tropismo del virus in questione, che può essere per un determinato tessuto o per un particolare tipo di cellule, oltre che dall'abilità del virus di definire una condizione di latenza o di infezione persistente. Tra questi virus, quelli che maggiormente determinano il rischio di vita o di danno a carico del rene trapiantato, sono HCMV, EBV, BKV e, come abbiamo dimostrato nella precedente sessione dei risultati, anche il parvovirus B19 (Barzon L *et al.*, JID 2009). A tal fine abbiamo deciso di approfondire l'indagine virologica condotta sulle biopsie del donatore, aggiungendo la valutazione della presenza delle sequenze genomiche virali per i suddetti virus anche a livello dei liquidi di conservazione o trasporto e i liquidi di lavaggio del rene prima che questo venga impiantato nel ricevente.

Non vi sono studi in letteratura che rivelino il valore diagnostico della ricerca delle sequenze virali nei liquidi di conservazione degli organi prima dell'impianto: nonostante sia possibile ipotizzare che i diversi tipi di campioni, tutti appartenenti al donatore, possano essere diversamente costituiti da varie frazioni cellulari. In particolare la biopsia risulta, ovviamente, arricchita di cellule renali residenti, il liquido di conservazione contiene invece cellule ematiche circolanti oltre a cellule proprie del rene e il liquido di lavaggio sarebbe costituito da cellule ematiche come pure da cellule endoteliali rilasciate durante il processo di lavaggio. Va inoltre

sottolineato che la biopsia è in ogni caso una procedura diagnostica invasiva, che non viene generalmente eseguita nei normali protocolli in Italia e che non sempre è possibile effettuare, al contrario le due soluzioni, di conservazione e di lavaggio, sono sempre disponibili o potenzialmente reperibili.

L'identificazione delle sequenze virali nelle biopsie e/o nelle soluzioni di conservazione e di lavaggio potrebbe essere inoltre più predittiva del rischio di trasmissione del virus dal donatore al ricevente rispetto al test sierologico.

Per condurre questa indagine abbiamo definito come "unità rene" (*Kidney Unit*, KU) l'insieme dei materiali reperiti del rene del donatore ovvero la biopsia (B), il liquido di conservazione/trasporto (preservation solution, PS) e il liquido di lavaggio (washing solution, WS) del rene.

3.6.1. Identificazione del DNA virale nell'unità rene.

I risultati di questa parte dello studio dimostrano la presenza delle sequenze genomiche virali nelle 75 unità rene (KU) donate, e soprattutto il DNA virale è stato rilevato nei liquidi di conservazione e nei liquidi di lavaggio, suggerendo che tali virus siano veicolati dal donatore al ricevente mediante le cellule del sangue contenute, seppure in quantità diverse, in entrambe le soluzioni. I livelli di identificazione virale erano sempre superiori nella frazione cellulare ottenuta in seguito alla centrifugazione delle soluzioni liquido di conservazione e liquidi di lavaggio e quindi l'indagine molecolare della presenza dei genomi virali è stata limitata solo a questa componente cellulare delle soluzioni.

Considerando i casi in cui almeno un campione dell'KU (biopsia, soluzione di trasporto e soluzione di lavaggio) risultava positivo, è risultato che 50 (66.7%) KU dei donatori erano positivi per almeno un virus, tra questi quelli più frequentemente identificati erano parvovirus B19 e EBV.

In particolare, il DNA di B19 è stato riscontrato in circa un terzo delle biopsie del rene del donatore, dei liquidi di trasporto e dei liquidi di lavaggio. È emersa una buona concordanza dei risultati della ricerca di B19-DNA nei diversi tipi di campioni della KU: i liquidi di trasporto e i liquidi di lavaggio erano positivi o negativi per B19-DNA in maniera concorde nel 85.3% dei casi; inoltre, in 31 su 34 (91.2%) KU positive per B19-DNA, erano positivi per B19-DNA il liquido di trasporto e/o il liquido di lavaggio (ovvero, solamente in 3 KU la biopsia renale era positiva per B19-DNA, mentre sia il liquido di trasporto sia il liquido di lavaggio erano negativi per B19-DNA).

Il DNA di EBV e HCMV è stato identificato solo in 2 biopsie del rene del donatore: entrambe mostravano concordanti risultati positivi sia nei liquidi di conservazione che di lavaggio. Il DNA

di EBV e HCMV è stato identificato maggiormente nei liquidi di lavaggio e di trasporto che nelle biopsie renali (Tabella 6).

	B19	EBV	HCMV	BKV
Biopsie	24 (32.0)	1 (1.3)	1 (1.3)	1 (1.3)
Liquidi di conservazione	22 (29.3)	11 (14.7)	4 (5.3)	2 (2.7)
Liquidi di lavaggio	26 (34.7)	17 (22.7)	2 (2.7)	0
Unità rene (KU)	35 (46.7)	21 (28.0)	5 (6.7)	3 (4.0)

Tabella 6. Prevalenza delle sequenze genomiche virali nelle biopsie ottenute da 75 reni di donatori ed effettuate prima dell'impianto.

Il DNA di BKV è stato rilevato soltanto in una biopsia e in due liquidi di conservazione (Tabella 6).

3.6.2. Confronto tra la sierologia del donatore e del ricevente e la presenza del DNA virale nell'unità rene.

I dati relativi alla sierologia del donatore e del ricevente analizzata al momento del trapianto sono riportati nella tabella 7, insieme ai dati relativi alle identificazioni di DNA virale nella KU.

	B19	EBV	HCMV
D+/KU+/R+	16	11	3
D+/KU+/R-	15	9	2
D+/KU-/R+	8	33	25
D+/KU-/R-	7	12	19
D-/KU+/R+	2	1	0
D-/KU-/R+	6	4	11
D-/KU+/R-	1	0	0
D-/KU-/R-	20	5	15

Tabella 7. Classificazione dei 75 riceventi di rene effettuata in funzione dello stato sierologico D/R e della presenza del DNA virale nell'unità rene del donatore.

Solo in 4 casi la KU era positiva per la ricerca di DNA di virus mentre il corrispondente donatore era sieronegativo:

- 1 caso in cui sia i liquidi di conservazione che i liquidi di lavaggio risultavano positivi per il DNA di EBV mentre il donatore era sieronegativo per EBV;
- 3 casi in cui i liquidi di conservazione e di lavaggio erano positivi per il DNA di B19 mentre i donatori erano sieronegativi per B19 (in un caso anche la biopsia è risultata B19-positiva).

3.6.3. Associazione tra l'identificazione del DNA virale nell'unità rene e rischio di infezione nel ricevente.

Per valutare se la presenza del DNA virale nelle biopsie, nei liquidi di conservazione e nei liquidi di lavaggio del donatore (ovvero nell'unità rene) può predire il rischio di infezione del ricevente, considerando anche lo stato sierologico del donatore/ricevete (D/R), è stata utilizzata l'analisi di Kaplan Meyer e il test del log-rank.

Parvovirus B19: L'analisi della stato sierologico D/R ha mostrato che i riceventi D-/R- per B19 avevano una bassa probabilità di comparsa di DNAemia nel periodo post trapianto se si raffrontava con le altre combinazioni D/R (Figura 25B).

La valutazione della presenza del DNA di B19 nell'unità rene permette di classificare in maniera migliore i riceventi e il loro rischio di comparsa di infezione sistemica causata da B19 di quanto è possibile fare utilizzando le informazione ottenute con l'indagine sierologia (Figura 25C): infatti i pazienti che hanno ricevuto una KU negativa per il DNA di B19 mostravano un rischio significativamente più basso di sviluppare l'infezione causata da B19 rispetto a quei riceventi che avevano ricevuto un rene positivo per le sequenze genomiche di B19 in uno qualunque dei campioni dell'unità rene, indipendentemente dalla condizione sierologia (log-rank, -2.68; p=.007).

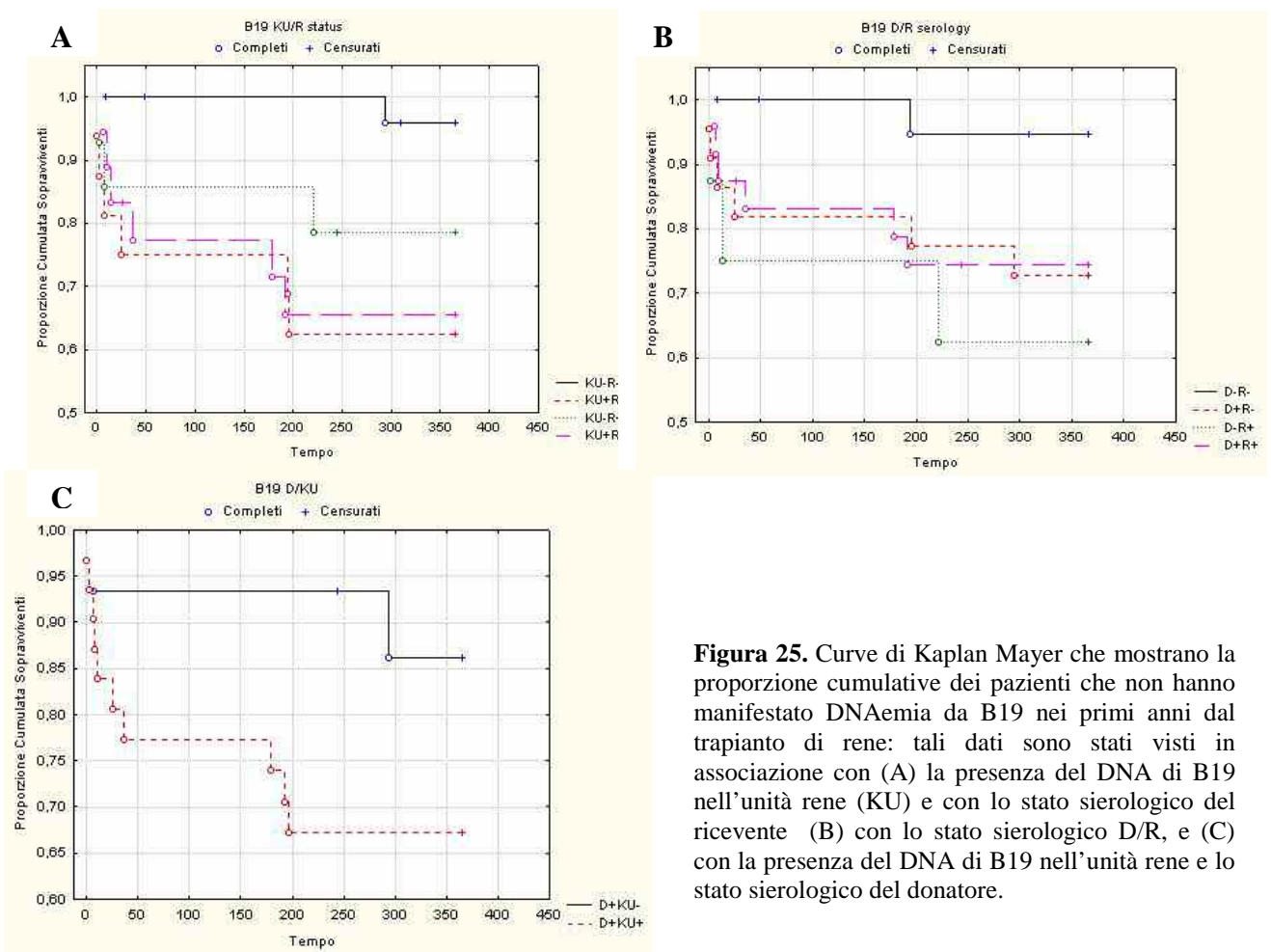


Figura 25. Curve di Kaplan Mayer che mostrano la proporzione cumulativa dei pazienti che non hanno manifestato DNAemia da B19 nei primi anni dal trapianto di rene: tali dati sono stati visti in associazione con (A) la presenza del DNA di B19 nell'unità rene (KU) e con lo stato sierologico del ricevente (B) e con lo stato sierologico del donatore (C) con la presenza del DNA di B19 nell'unità rene e lo stato sierologico del donatore.

Inoltre è risultato particolarmente interessante constatare come tra i riceventi di donatori sieronegativi per B19, quelli che hanno ricevuto una KU B19-positiva mostravano un più elevato rischio di episodi di DNAemia durante il primo anno dal trapianto, rispetto a quelli che avevano ricevuto un rene negativo per il DNA di B19, sebbene tale differenza non ha mostrato significatività statistica (Figura 25A). Il rischio di sviluppare DNAemia da B19 nel periodo post trapianto era particolarmente elevato anche se si consideravano separatamente i risultati ottenuti nelle sole biopsie (log-rank, -3.02; $p = .002$), nei liquidi di lavaggio (log-rank, -2.29; $p = .02$) oppure nei soli liquidi di trasporto (log-rank, -2.11 $p = .03$).

EBV: Dall'analisi della condizione sierologica D/R è emerso che i riceventi D+/R- per EBV hanno un rischio maggiore di incorrere in episodi di DNAemia da EBV rispetto ai riceventi D+/R+ (log-rank, 1.75; $p = .08$; figura 26A). L'analisi della presenza del DNA di EBV a livello della KU permette inoltre di identificare, nel sottogruppo di riceventi D+/R-, quello con un più

elevato rischio di insorgenza di infezione virale causata da EBV nel breve periodo dopo il trapianto in quanto ricevente di una KU EBV-positiva (log-rank, = -1.87; p = .06; figura 26B,C).

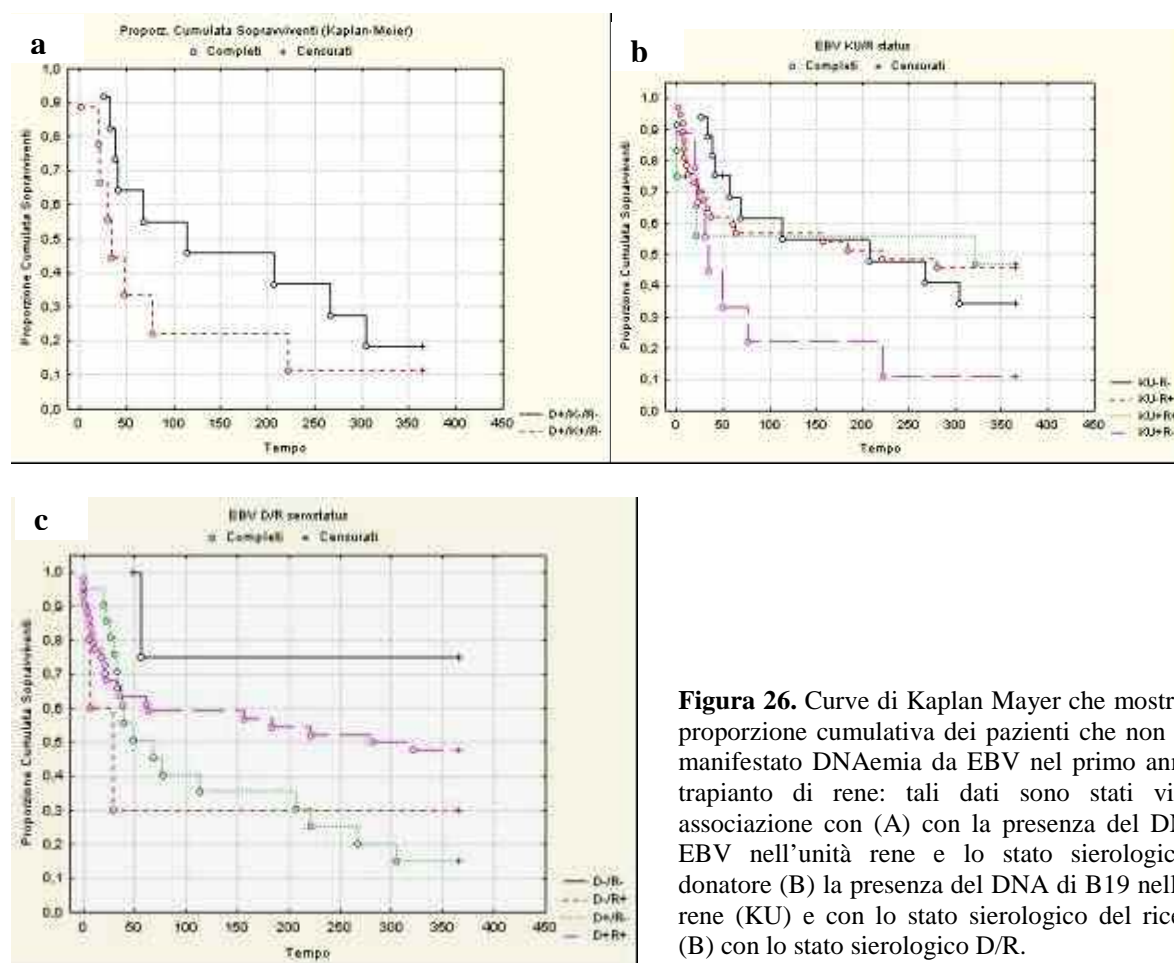


Figura 26. Curve di Kaplan Mayer che mostrano la proporzione cumulativa dei pazienti che non hanno manifestato DNAemia da EBV nel primo anno dal trapianto di rene: tali dati sono stati visti in associazione con (A) con la presenza del DNA di EBV nell'unità rene e lo stato sierologico del donatore (B) la presenza del DNA di B19 nell'unità rene (KU) e con lo stato sierologico del ricevente (B) con lo stato sierologico D/R.

HCMV: I ricevanti classificati come D+/R- per quanto riguarda la sierologia del virus HCMV, mostrano rischio significativamente più elevato di insorgenza di infezione da HCMV nel periodo post-trapianto di rene (log-rank, $P < 0.0001$; Figura 27) rispetto a tutte le altre categorie D/R. In questi pazienti l'infezione da HCMV avviene generalmente nei primi mesi post-trapianto. In particolare 5 pazienti hanno ricevuto un KU positiva per il DNA di HCMV, di questi, 2 ricevanti, sieronegativi per HCMV al momento del trapianto, hanno presentato un'infezione sistemica sintomatica causata da HCMV dopo pochi giorni dal trapianto: 8 giorni, in un caso, e 22 giorni nell'altro.

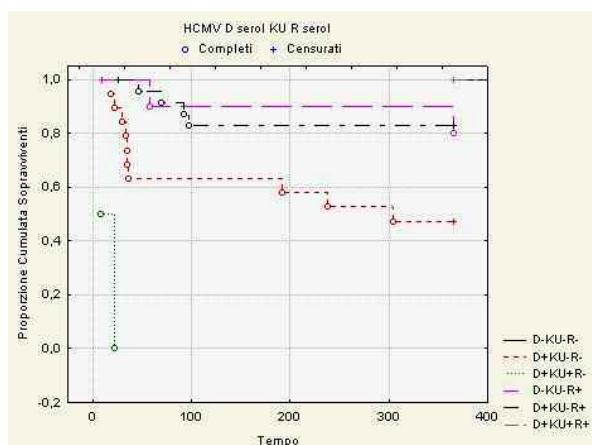


Figura 27. Curve di Kaplan Mayer che mostrano la proporzione cumulative dei pazienti che non hanno manifestato DNAemia da HCMV nel primo anno di follow-up post trapianto e in associazione con lo stato sierologico D/R e la presenza di DNA virale nell’KU.

BKV: Dei 3 pazienti che hanno ricevuto un rene positivo per il DNA di BKV all’analisi dell’unità rene, il ricevente che mostrava la biopsia positiva per il genoma di BKV, ha sviluppato DNAemia da BKV dopo 16 giorni dal trapianto (Figura 28).

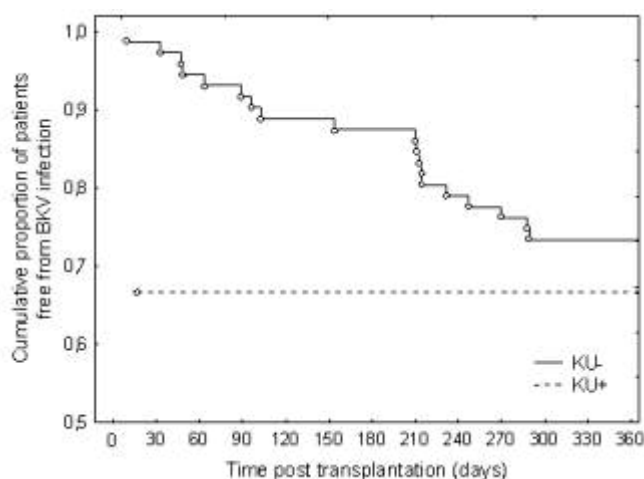


Figura 28. Curve di Kaplan Mayer che mostrano la proporzione cumulative dei pazienti che non hanno manifestato DNAemia da BKV nel primo anno post-trapianto in accordo con la presenza di DNA virale nell’KU.

3.6.4. Valutazione della comparsa di DNAemia in corso di follow-up.

In questa parte dello studio sono stati considerati anche i dati relativi alle indagini cliniche atte a valutare la funzionalità del rene trapiantato. Infatti è stata studiata la possibile associazione tra la comparsa di infezione virale sistemica (descritta in termini di DNAemia) durante un qualsiasi momento del follow-up di un anno e la corrispondente positività per il genoma del virus responsabile a livello dell’unità rene.

In particolare durante i primi 12 mesi dal trapianto sono stati descritti 16 pazienti che hanno presentato DNAemia per il parvovirus B19. Di questi, 12 avevano ricevuto un’unità rene positiva

per il DNA di B19 e, tra questi, 7 erano sieronegativi per il virus in questione al momento del trapianto. In molti casi la presenza di DNAemia è iniziata durante le prime settimane dopo il trapianto. Dei pazienti che hanno presentato DNAemia per il parvovirus B19, 4 hanno avuto infezione sintomatica con anemia iporigenerativa e, in un caso, microangiopatia trombotica a carico del rene trapiantato.

Complessivamente, dopo 12 mesi dal trapianto di rene, almeno un episodio di DNAemia da EBV era stata riferita per 40 pazienti, dei quali 6, che erano D+/R- per EBV, avevano avuto anche la sintomatologia associata all'infezione primaria causata da EBV: mononucleosi con linfadenomegalia e faringite. In uno di questi pazienti la malattia è progredita in linfoma a cellule B che ha determinato la morte del paziente 10 mesi dopo il trapianto di rene.

Nonostante la profilassi anti-HCMV effettuata secondo il protocollo clinico descritto (Montini G *et al.*, *Transplant International* 2005), 18 riceventi hanno presentato episodi di DNAemia da HCMV, 12 dei quali erano sierologicamente negativi per il HCMV al momento del trapianto e avevano ricevuto un rene da donatore sierologicamente positivo per lo stesso virus. Di questi 12 riceventi D+/R-, 2 avevano ricevuto un'unità rene positiva per il DNA di HCMV e hanno manifestato un'infezione sintomatica HCMV-correlata molto presto dopo il trapianto, cioè dopo 8 giorni in un caso e 22 giorni nell'altro. Per quanto riguarda il BKV, 20 pazienti hanno manifestato DNAemia durante il primo anno di follow-up, compreso il paziente che aveva ricevuto l'unità rene che presentava la biopsia positiva per il DNA di BKV e con DNAemia comparsa immediatamente dopo il trapianto di rene. Un caso di infezione sintomatica determinata da BKV e caratterizzata da uretrite e grave nefrite, che ha determinato la perdita del rene trapiantato, si è verificata sette mesi dopo il trapianto in un paziente che aveva ricevuto una KU negativa per il DNA di BKV.

3.7. Ricerca del DNA dei nuovi poliomavirus, KIV e WUV, nell'unità rene.

La ricerca delle sequenze genomiche virali dei nuovi poliomavirus WUPyV e KIPyV sia nei donatori, ovvero in tutti i campioni dell'unità rene sia nei riceventi durante il primo anno di follow-up, non ha dato nessun risultato positivo: tale esito non permette di concludere che tali virus non possano infettare il rene del paziente pediatrico immunocompromesso data la bassa numerosità di casi, e la scarsa conoscenza sul tipo di tropismo di tali virus. Certamente possiamo ipotizzare che non siano patogeni che frequentemente colpiscono il rene sia sano, come nel caso del rene del donatore, sia dopo il trapianto, quindi nel ricevente immunocompromesso.

CAPITOLO 4

DISCUSSIONE

Nel presente lavoro di tesi viene analizzata la presenza di infezioni virali intrarenali e sistemiche e la loro associazione con la comparsa di lesioni del rene dopo il trapianto in una popolazione di pazienti pediatrici. In letteratura non vi sono precedenti lavori in cui sia stato condotto questo tipo di indagine, anche se recenti trattati (Fishman JA *et al.*, N Engl J Med 2007) hanno evidenziato quanto sia sempre più difficile riconoscere la presenza di infezioni nei pazienti immunocompromessi rispetto alle persone con un normale sistema immunitario, poiché la caratteristica sintomatologia è di regola attenuata. Inoltre lo spettro dei potenziali patogeni responsabili della comparsa di danno renale può variare e le nuove infezioni avere una progressione più rapida tale da richiedere una veloce identificazione. È per questa ragione che abbiamo voluto valutare un ampio numero di virus e approfondire l'indagine virale con nuove e rapide metodiche molecolari che ci hanno permesso di definire nuovi possibili test diagnostici che potrebbero complementare l'attuale indagine condotta sulle biopsie del rene effettuate prima e durante il follow-up post trapianto. Obiettivi dello studio sono stati (i) identificare quali virus siano associati a rigetto acuto o cronico del rene trapiantato; (ii) sviluppare tecniche non invasive di tipo molecolare per la ricerca di virus che possano fornire una tempestiva informazione sulle possibili infezioni trasmesse attraverso l'organo da trapiantare.

Il lavoro è stato quindi articolato in due parti principali:

- l'iniziale studio delle infezioni virali intrarenali come possibili fattori di rischio di insorgenza di lesioni del rene dopo il trapianto;
- la successiva ricerca di nuove analisi molecolari sul rene da trapiantare predittive del rischio di infezioni virali post-trapianto.

Il trapianto di rene resta l'unica alternativa per riabilitare totalmente un bambino con malattie renali croniche (Smith JM *et al.*, *Pediatr Transpl* 2002). A tale "terapia sostitutiva" sono però associati molteplici altri aspetti clinici che riguardano, in modo particolare, il paziente pediatrico trapiantato di rene. Una volta riuscito il trapianto di rene, occorre definire un corretto follow-up del paziente, monitorando eventuali complicazioni della funzionalità dell'organo trapiantato che potrebbero presupporre ad episodi di rigetto. Il rischio di vita, in seguito al trapianto di rene nel bambino permane, ed è di circa il 5% dall'anno del trapianto (Harzallah K *et al.*, *Archives de pédiatrie* 2004). Le principali cause di mortalità sono le infezioni, in particolar modo quelle virali

(Dharnidharka VR *et al.*, Transplantation 2006), oltre a leucemie, altre neoplasie ed effetti collaterali dovuti ad un errata terapia immunosoppressiva. Le principali tipologie di lesioni osservate nel rene del paziente pediatrico trapiantato di rene sono, come per il paziente adulto sottoposto a trapianto renale (Nankivell BJ *et al.*, N Engl J Med 2003), il rigetto acuto e il rigetto cronico, che potrebbero comportare la perdita dell'organo trapiantato. Tuttavia tra le complicazioni più frequenti, la lesione cronica è certamente la principale causa della perdita del rene trapiantato riconducibile ad effetti immunologici e non immunologici. Nel paziente pediatrico, rispetto ad un ricevente adulto, varia lo stato immunologico, e, oltre ad essere immunosoppresso per la terapia post trapianto, risulta *naive* per numerose infezioni, sia virali che batteriche, ed è dunque più facilmente colpito da infezioni da patogeni opportunistici, come ad esempio le infezioni virali (Dharnidharka VR *et al.*, Transplantation 2006). Tra i virus responsabili di infezioni nel paziente trapiantato di organo solido, il ruolo dominante è svolto dai virus erpetici (HCMV, EBV, HHV6, HHV7, HHV8 e VZV) soprattutto nei primi mesi post-trapianto, mentre altri virus, come il poliomavirus BK e il parvovirus B19 sono importanti patogeni con tropismo renale che sembrano subentrare in tempi più lunghi dal trapianto. Dunque comprendere sempre meglio la biologia delle infezioni virali associata alla patologia renale, è essenziale per migliorare il decorso del paziente pediatrico dopo il trapianto di rene.

Date queste premesse, va sottolineato che la novità di questo studio consiste nel dimostrare che il DNA virale è rilevabile in circa il 50% dei reni sani, come potremo considerare il rene del donatore analizzato prima dell'impianto, e nel 70% dei reni dei riceventi durante due anni di follow-up. Inoltre è stato osservato, per la prima volta, che la persistenza del DNA di B19, ovvero la presenza delle sequenze genomiche virali in almeno due tempi del follow-up, è associata, in maniera statisticamente significativa, allo sviluppo di lesioni croniche nel rene durante il periodo post-trapianto. Questo studio ha inoltre confermato che l'infezione sistemica da HCMV è un fattore di rigetto acuto del rene trapiantato.

Dalla ricerca delle sequenze genomiche virali nelle biopsie del rene del donatore è emerso che circa un terzo dei reni dei donatori sono positivi per il DNA di B19: tale dato è in accordo con quanto riportato dalla letteratura in merito alla prevalenza del DNA di B19 nel rene sano (Moudgil A *et al.*, Kidney Int 2001). Il presente studio dimostra che la persistenza di parvovirus B19 nel rene trapiantato si associa ad un rischio più elevato di comparsa dei danni cronici al rene trapiantato (Barzon L *et al.*, JID 2009).

Dati della letteratura dimostrano che l'infezione attiva causata dal parvovirus B19 nei trapiantati di rene è associata con la comparsa di anemia aplastica acuta e cronica (Neild G *et al.*, Lancet 1986; Cavallo R *et al.*, J Clin Virol 2003; Ki CS *et al.*, Clin Transplant 2005), disfunzione renale (Eid AJ *et al.*, Clin Infect Dis 2006), glomerulopatia collassante (Moudgil A *et al.*, Kidney Int 2001) e microangiopatia trombotica del rene trapiantato (Murer L *et al.*, 2000). Sono stati

descritti nel presente studio anche due episodi di disfunzione acuta del rene trapiantato associati a microangiopatia trombotica e rigetto anticorpo-mediato dovuti all'infezione da parvovirus B19. Nella maggior parte dei pazienti trapiantati in cui era dimostrata la presenza intrarenale del DNA di B19, il DNA virale persisteva ed era riscontrabile nelle successive biopsie del follow-up post-trapianto. Inoltre è stato possibile constatare che la persistenza asintomatica del DNA di B19 nel rene trapiantato e la DNAemia da B19 erano associate ad un più elevato rischio di insorgenza di lesioni croniche dell'organo trapiantato. In ogni caso resta da dimostrare quale sia il *reservoir* cellulare dell'infezione da parvovirus B19: è probabile che il virus infetti e persista nelle cellule endoteliale ed epiteliali del rene (Waldman M *et al.*, Nat Clin Pract Nephrol 2007). È possibile ipotizzare che le lesioni renali in presenza di DNA di B19 siano determinate dalla replicazione persistente del virus nel rene trapiantato, favorita dallo stato immunosoppressivo del paziente. L'infezione attiva e persistente da B19 potrebbe danneggiare altri tessuti, come è stato dimostrato in soggetti con disfunzioni cardiache del ventricolo sinistro nei quali le biopsie dell'endomiocardio erano positive per B19 (Kühl U *et al.*, Circulation 2005). In questi pazienti la *clearance* del DNA virale è stata associata con un netto miglioramento emodinamico, mentre, al contrario, la persistenza del genoma virale si associava ad una ridotta funzionalità ventricolare (Kühl U *et al.*, Circulation 2005).

Il presente studio dimostra che anche la presenza dei genomi di virus erpetici si associano con la comparsa di lesioni del rene trapiantato.

Le malattie correlate agli herpesvirus, specialmente i disordini linfoproliferativi derivati dall'infezione da EBV e le patologie associate a HCMV, rappresentano importanti complicazioni nel paziente trapiantato di rene (Kotton CN *et al.*, JASN 2005; Sagedal S *et al.*, Am J Transplant 2002). La presenza di herpesvirus nel rene trapiantato è stata analizzata fino ad ora soltanto da Sebekova *et al.*, che ha dimostrato come l'identificazione del DNA di HCMV, EBV, HHV-6, e HHV-7 nel tessuto del rene nel periodo post trapianto è associata alle lesioni croniche dell'organo trapiantato (Sebeková K *et al.*, Pediatr Transplant 2005). Anche nel presente lavoro, l'identificazione del DNA virale di un qualsiasi virus, era associata in maniera statisticamente significativa con la comparsa di lesioni croniche dell'organo trapiantato. Se invece si considera il singolo virus, la presenza intrarenale del DNA degli herpesvirus non era significativamente associata con le lesioni del rene trapiantato, anche se la persistenza del DNA di EBV era identificata più spesso, anche se non in modo statisticamente significativo, in pazienti che svilupparono rigetti acuti subclinici. Invece, la persistenza del DNA di HHV6 non era associata con la comparsa di lesioni istologiche nè con l'insorgenza di disfunzioni del rene trapiantato. A questo proposito, i lavori presenti in letteratura mostrano pareri discordanti (Babel N *et al.*, Transplantation 2001; Yoshikawa T *et al.*, Transplantation 1992; Herbein G *et al.*, Clin Infect Dis 1996; Tong CY *et al.*, Transplantation 2002). Dall'indagine condotta in questo studio,

è emerso che la presenza intrarenale del DNA di HCMV risultava essere abbastanza rara nonostante i numerosi episodi di DNAemia da HCMV, sia asintomatica che sintomatica. Abbiamo inoltre dimostrato che gli episodi di DNAemia da HCMV rappresentano un fattore di rischio per la comparsa di rigetti acuti identificati istologicamente: questa osservazione è in accordo con quanto descritto in letteratura (Sagedal S., *et al.* Am J Transplant 2002; Reinke P. *et al.*, Lancet 1994; Lowance D. *et al.*, N Engl J Med 1999). Dato che il DNA di HCMV non è stato frequentemente identificato nelle biopsie di rene, probabilmente il virus determina il rigetto acuto attraverso un effetto indiretto mediato della risposta immunitaria e infiammatoria dell'ospite immunosoppresso (Kotton CN *et al.*, JASN 2005). D'altro canto, le terapie immunosoppressive anti-rigetto predispongono alle patologie associate al HCMV.

In merito alle infezioni da poliomavirus umani, quali il BKV e il JCV, esistono diversi studi in letteratura che li collocano tra i virus responsabili dell'insorgenza di disfunzioni renali e di lesioni istologiche che possono causare la perdita dell'organo trapiantato. È riportato in letteratura che l'infezione attiva causata dal BKV determina un danno renale progressivo (nefropatia da BKV) nel 5% dei riceventi che sono stati sottoposti al trapianto di rene (Hirsch HH *et al.*, N Engl J Med 2002) come osservato in due pazienti del presente studio. Questo studio dimostra che il DNA di BKV era frequentemente identificabile anche nel rene trapiantato di pazienti asintomatici, nei quali il virus determinava infezioni persistenti.

Non è stato possibile però descrivere per il BKV un'associazione statisticamente significativa tra la presenza e persistenza del genoma virale intrarenale e la comparsa di modificazioni istologiche a carico del rene trapiantato. Non è possibile però escludere che siano necessari periodi superiori a due anni di follow-up post trapianto di rene per constatare se la persistenza intrarenale del DNA di BKV possa in qualche modo determinare dei cambiamenti istologici del rene (Hirsch HH *et al.*, N Engl J Med 2002; Bressollette-Bodin C *et al.*, Am J Transplant 2005). Per quanto riguarda JCV, contrariamente a BKV, è stato raramente identificato nel rene della popolazione pediatrica da noi studiata anche se dati della letteratura lo associano comunque alla comparsa di lesioni renali post-trapianto.

Nella prima parte del presente studio sono stati studiati numerosi virus, e tra questi, quelli più presenti erano HCMV, EBV, BKV, e parvovirus B19, ma solamente parvovirus B19 si associava a disfunzioni e danno al rene trapiantato. Nella seconda parte dello studio, ci siamo concentrati sull'analisi delle infezioni causate da HCMV, EBV, BKV e B19 per investigare la possibilità di approfondire e migliorare l'indagine virale sul rene del donatore come possibile responsabile della trasmissione dell'infezione virale al ricevente attraverso la messa a punto di nuovi test molecolari. Tutti questi virus potrebbero essere infatti già presenti nel organo che viene donato e non essere identificati durante l'indagine pre-trapianto sia perché sono in una situazione di latenza o anche perché sfuggono al tipo di screening a cui viene generalmente sottoposto il

donatore. Quindi per migliorare l'analisi condotta sul donatore, abbiamo studiato la possibile presenza dei genomi virali in diversi campioni ottenuti dall'organo del donatore. Nel caso specifico abbiamo ricercato il DNA virale nelle biopsie, nel liquido di conservazione e nel liquido di lavaggio del rene prima del trapianto. Questo perché, dato il diverso tropismo virale, se si considerano diversi materiali contenenti differenti componenti cellulari (cellule ematiche e cellule residenti del rene) tutte appartenenti al donatore, è possibile aumentare la probabilità di diagnosticare l'infezione nell'organo prima che questo venga impiantato e che l'infezione venga trasmessa al ricevente. È per questo motivo che l'investigazione delle sequenze genomiche virali sia nella biopsia, nel liquido di trasporto e nel liquido di lavaggio del rene del donatore, globalmente definiti come *unità rene*, hanno aumentato la sensibilità del test del DNA virale intrarenale dando nuove indicazioni sui criteri di trasmissione virale attraverso l'organo trapiantato.

Infatti, in accordo con la sua capacità di andare in latenza nelle cellule B, nel caso di EBV, e nelle cellule progenitrici dei monociti, per quanto riguarda HCMV, l'infezione causata da questi virus è veicolata dalle cellule ematiche circolanti e per questo il loro DNA virale è stato identificato principalmente nei liquidi di lavaggio e di conservazione del rene. Tali soluzioni infatti sono principalmente arricchite da cellule ematiche e di meno dalle cellule residenti del rene come lo è invece è la biopsia. Il parvovirus B19 è stato ritrovato più frequentemente nella biopsie rispetto alle soluzioni di conservazione e di lavaggio del rene, quindi si presuppone che tale virus infetti le cellule residenti del rene, che potrebbero essere la principale fonte di trasmissione dell'infezione dal donatore al ricevente.

Il poliomamavirus BK si suppone abbia un tropismo per il rene e raggiunga uno stato di latenza a livello delle cellule epiteliali tubulari del rene. Tuttavia, nel presente studio, il DNA di BKV è stato rilevato solo in una biopsia del rene di un donatore, mentre lo stesso DNA virale era generalmente presente nel rene trapiantato durante il follow-up, dove persisteva in successivi campionamenti (Barzon L. *et al.*, JID 2009).

In questo studio, ancora più interessante è la dimostrazione che la presenza del DNA virale in almeno uno dei campioni dell'unità rene è associata con un aumentato rischio di insorgenza di un'infezione virale sintomatica specialmente nell'immediato periodo post-trapianto. Inoltre, poiché i livelli di DNA virale identificati nei liquidi di lavaggio e di conservazione sono superiori o uguali ai livelli di identificazione nella biopsia renale e per la maggiore capacità di determinare il rischio di infezione, l'indagine molecolare a livello delle soluzioni potrebbe evitare di effettuare la biopsia che resta comunque una procedura diagnostica piuttosto invasiva. I dati relativi alla ricerca del DNA virale a livello dell'unità rene sono stati analizzati assieme a quelli della sierologia del rispettivo donatore/ricevente per osservare possibili associazioni e per valutare la

congruenza dei risultati molecolari e sierologici in modo da impiegare eventualmente il test migliore o la combinazione dei test per lo studio delle infezioni nel donatore.

Ciò che è emerso è che il test del DNA virale nell'unità rene è più specifico rispetto all'indagine virologica nel predire il rischio di trasmissione virale al ricevente e la comparsa delle infezioni sintomatiche. Infatti, il test del DNA di B19 nei campioni dell'unità rene ha permesso di identificare correttamente i riceventi il rene da donatore sieropositivo come i pazienti con un rischio più elevato di infezione post-trapianto, mentre la valutazione della condizione sierologica del donatore e del ricevente (D/R) per il virus B19 sembra essere meno efficace. Analogamente, i pazienti sieronegativi per EBV e che avevano ricevuto l'unità rene positiva per il DNA di EBV, hanno dimostrato un rischio superiore di incorrere in infezioni da EBV nel periodo post trapianto rispetto ai pazienti che avevano ricevuto un unità negativa per il DNA di EBV e proveniente da donatore sieropositivo. Sebbene il test del DNA per HCMV eseguito sui campioni dell'unità rene identifichi correttamente i riceventi che hanno sviluppato infezione associata a HCMV nel periodo post-trapianto, la valutazione sierologica del donatore ha mostrato una sensibilità superiore rispetto al test molecolare. Al contrario, nonostante il noto tropismo del poliomavirus BK per il rene, il test del DNA di BKV, effettuato sui campioni dell'unità rene, ha dimostrato una scarsa utilità diagnostica. Dunque, è possibile concludere che l'utilità del test molecolare per identificare le possibili infezioni trasmesse dal donatore al ricevente dipende dalle proprietà replicative del virus e dal tipo di tropismo che esso ha per le cellule e/o il tessuto dell'organo da trapiantare.

CAPITOLO 5

CONCLUSIONE

Con il presente studio viene condotta per la prima volta un'ampia indagine riguardante le infezioni intrarenali e sistemiche che interessano il paziente pediatrico trapiantato di rene. È stato possibile concludere che le infezioni virali sono importanti fattori di rischio per l'insorgenza di lesioni del rene trapiantato che possono comparire in tempi diversi dal trapianto in base anche al tipo di virus coinvolto. Oltre a confermare l'associazione tra la comparsa di DNAemia da HCMV, anche asintomatica, e la comparsa di rigetti acuti, il presente studio dimostra un dato totalmente nuovo riguardante la presenza di diversi tipi di genomi virali in un elevato numero di reni sottoposti a trapianto. In molti casi le infezioni virali osservate erano causate da virus il cui DNA persisteva nelle successive biopsie del follow-up e in taluni casi erano anche infezioni asintomatiche, fatta eccezione di alcuni casi di manifestazioni acute. Sebbene fossero asintomatiche, molte infezioni intrarenali persistenti, in particolar modo quelle determinate dal parvovirus B19, erano associate con un elevato rischio di sviluppare lesioni nell'organo trapiantato che possono essere considerate predittive della perdita della funzionalità del rene nel lungo tempo.

Inoltre, come dimostrato nella seconda parte dello studio, l'identificazione di acidi nucleici virali nei liquidi di conservazione nei liquidi di lavaggio degli organi solidi, come ad esempio il rene, prima dell'impianto potrebbe essere di particolare utilità per identificare quei riceventi che hanno un più elevato rischio di contrarre l'infezione virale in seguito del trapianto. Tale indagine è risultata utile soprattutto nel caso di infezioni asintomatiche che compaiono nell'immediato periodo dopo il trapianto. Va detto inoltre che la sensibilità e la specificità di tale test molecolare dipende dal tropismo cellulare per le cellule o per il tessuto dell'organo trapiantato.

Dunque, una corretta indagine e un appropriato trattamento delle infezioni virali intrarenali che colpiscono il paziente pediatrico trapiantato di rene, potrebbero migliorare la sopravvivenza del rene trapiantato.

BIBLIOGRAFIA

- Acott PD**, Crocker JF, Lee S. Simulect and HHV-6 in pediatric renal transplantation. *Transplant Proc.* 2004 (Suppl)
- Allander T**, Andreasson K, Gupta S *et al.*; Identification of a third human polyomavirus. *J Virol.* 2007
- Allen UD**, Human herpesvirus type 8 infections among solid organ transplant recipients. *Pediatr Transplant.* 2002
- Babel N**, Schwarzmann F, Prang N *et al.*; Association between Epstein-Barr virus infection and late acute transplant rejection in long-term transplant patients. *Transplantation.* 2001
- Baiocchi OC**, Colleoni GW, Caballero OL *et al.*; Quantification of Epstein-Barr viral load and determination of a cut-off value to predict the risk of post-transplant lymphoproliferative disease in a renal transplant cohort. *Haematologica.* 2004
- Barzon L**, Murer L, Pacenti M *et al.*; Investigation of Intrarenal Viral Infections in Kidney Transplant Recipients Unveils an Association between Parvovirus B19 and Chronic Allograft Injury. *J Infect Dis.* 2009
- Benfield MR**, McDonald RA, Bartosh S *et al.*; Changing trends in pediatric transplantation: 2001 Annual Report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study. *Pediatr Transplant.* 2003
- Bialasiewicz S**, Whiley DM, Lambert SB *et al.*; Development and evaluation of real-time PCR assays for the detection of the newly identified KI and WU polyomaviruses. *J Clin Virol.* 2007
- Bonvicini F**, Filippone C, Delbarba S *et al.*; Parvovirus B19 genome as a single, two-state replicative and transcriptional unit. *Virology.* 2006
- Brennan DC**, Storch GA, Singer GG *et al.*; The prevalence of human herpesvirus-7 in renal transplant recipients is unaffected by oral or intravenous ganciclovir. *J Infect Dis* 2000
- Bressollette-Bodin C**, Coste-Burel M, Hourmant M *et al.*; A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2005
- Bruggeman LA**. Viral subversion mechanisms in chronic kidney disease pathogenesis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007
- Cainelli F**, Vento S. Infections and solid organ transplant rejection: a cause-and-effect relationship? *Lancet Infect Dis.* 2002
- Cavallo R**, Merlino C, Re D *et al.*; B19 virus infection in renal transplant recipients. *J Clin Virol.* 2003

Corcoran A, Doyle S. et al.; Advances in the biology, diagnosis and host-pathogen interactions of parvovirus B19. *J Med Microbiol.* 2004

Deborska D, Durlík M, Sadowska A et al.; Human herpesvirus-6 in renal transplant recipients: potential risk factors for the development of human herpesvirus-6 seroconversion. *Transplant Proc.* 2003

Dharnidharka VR, Caillard S, Agodoa LY *et al.*; Infection frequency and profile in different age groups of kidney transplant recipients. *Transplantation.* 2006

Eid AJ, Brown RA, Patel R *et al.*; Parvovirus B19 infection after transplantation: a review of 98 cases. *Clin Infect Dis.* 2006

Ekman A, Hokynar K, Kakkola L et al.; Biological and immunological relations among human parvovirus B19 genotypes 1 to 3. *J Virol.* 2007

Ferrareso M, Berardinelli L. Nosocomial infection in kidney transplant recipients: a retrospective analysis of a single-center experience. *Transplant Proc.* 2005

Fishman JA, Greenwald MA, Kuehnert MJ Enhancing transplant safety: a new era in the microbiologic evaluation of organ donors? *Am J Transplant.* 2007

Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *Fishman JA et al., NEJM* 1998

Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *NEJM* 2007

Gourishankar S, McDermid JC, Jhangri GS et al.; Herpes zoster infection following solid organ transplantation: incidence, risk factors and outcomes in the current immunosuppressive era. *Am. J Transplant* 2004

Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM et al.; Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog.* 2007

Harzallah K, Floret D, Martin X et al. ; Mortality in pediatric renal transplants: 15 years' experience. *Arch Pediatr.* 2004

Herman J, Van Ranst M, Snoeck R et al.; Polyomavirus infection in pediatric renal transplant recipients: evaluation using a quantitative real-time PCR technique. *Pediatr Transplant.* 2004

Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M et al.; Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med.* 2002
Clin Transplant. 2005 Dec;19(6):751-5. Links

Ki CS, Kim IS, Kim JW et al.; Incidence and clinical significance of human parvovirus B19 infection in kidney transplant recipients. *Transplantation* 2003

Kotton CN, Fishman JA Viral infection in the renal transplant recipient. *J Am Soc Nephrol.* 2005

Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M et al.; High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation.* 2005

Liefeldt L, Plentz A, Klempa B et al.; Recurrent high level parvovirus B19/genotype 2 viremia in a renal transplant recipient analyzed by real-time PCR for simultaneous detection of genotypes 1 to 3. *J Med Virol.* 2005

Ljungman P. Beta-herpesvirus challenges in the transplant recipient. *J Infect Dis.* 2002

Lowance D, Neumayer HH, Legendre CM Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation. International Valacyclovir Cytomegalovirus Prophylaxis Transplantation Study Group. *NEJM* 1999

Lufft V, Tusch G, Offner G et al.; Kidney transplantation in children: impact of young recipient age on graft survival. *Nephrol Dial Transplant.* 2003

Luppi M, Barozzi P, Rasini V et al.; Severe pancytopenia and hemophagocytosis after HHV-8 primary infection in a renal transplant patient successfully treated with foscarnet. *Transplantation.* 2002

Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Hanson JA et al.; Exponentially increased risk of infectious death in older renal transplant recipients. *Kidney Int.* 2001

Milstone A, Vilchez RA, Geiger X et al. ; Polyomavirus simian virus 40 infection associated with nephropathy in a lung-transplant recipient. *Transplantation.* 2004

Mitchell BM, Bloom DC, Cohrs RJ et al.; Herpes simplex virus-1 and varicella-zoster virus latency in ganglia., *J Neurovirol.* 2003
Aug;6(8):707-17. Links

Mocarski ES Jr. Immune escape and exploitation strategies of cytomegaloviruses: impact on and imitation of the major histocompatibility system. *Cell Microbiol.* 2004

Moffatt S, Yaegashi N, Tada K et al.; Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J Virol.* 1998

Montini G, Murer L, Ghio L, et al. One-year results of basiliximab induction and tacrolimus associated with sequential steroid and MMF treatment in pediatric kidney transplant recipient. *Transplant International* 2005

Moudgil A, Nast CC, Bagga A et al.; Association of parvovirus B19 infection with idiopathic collapsing glomerulopathy. *Kidney Int.* 2001
Jun;11(6):1132-7. Links

Murer L, Zacchello G, Bianchi D et al.;Thrombotic microangiopathy associated with parvovirus B 19 infection after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2000

Nankivell BJ, Borrowers RJ, Fung C L et al.; The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003

Neild G, Anderson M, Hawes S et al.; Parvovirus infection after renal transplant. *Lancet* 1986;

Norja P, Ubillos I, Templeton K et al.; No evidence for an association between infections with WU and KI polyomaviruses and respiratory disease. *J Clin Virol*. 2007

Parada B, Figueiredo A, Nunes P et al.; Pediatric renal transplantation: comparative study with renal transplantation in the adult population. *Transplant Proc*. 2005

Racusen LC, Solez K, Colvin RB et al. ; The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int*. 1999

Randhawa P, Baksh F, Aoki N et al.; JC virus infection in allograft kidneys: analysis by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Transplantation*. 2001

Reinke P, Fietze E, Ode-Hakim S et al.; Late-acute renal allograft rejection and symptomless cytomegalovirus infection. *Lancet* 1994;

Rimar D, Rimar Y, Keynan Y et al.; Human herpesvirus-8: beyond Kaposi's. *Isr Med Assoc J*. 2006

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

Salvatierra O et al. Pediatric renal transplantation. *Transplant Proc*. 1999

Sarwal MM, Yorgin PD, Alexander S et al.; Promising early outcomes with a novel, complete steroid avoidance immunosuppression protocol in pediatric renal transplantation. *Transplantation* 2001

Sebeková K, Feber J, Carpenter B et al.; Tissue viral DNA is associated with chronic allograft nephropathy. *Pediatr Transplant*. 2005

Shah KV, Daniel RW, Warszawski RM. et al.; High prevalence of antibodies to BK virus, an SV40-related papovavirus, in residents of Maryland. *J Infect Dis* 1973

Singh N. Infections in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis*. 1999

Solez K, Colvin RB, Racusen LC et al. ; Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007

Squifflet JP, Legendre C. The economic value of valganciclovir prophylaxis in transplantation. *J Infect Dis*. 2002

Straathof KC, Savoldo B, Heslop HE et al. Immunotherapy for post-transplant lymphoproliferative disease. *Br J Haematol* 2002

Taber DJ, Ashcraft E, Baillie GM et al.; Valganciclovir prophylaxis in patients at high risk for the development of cytomegalovirus disease. *Transpl Infect Dis*. 2004

Taguchi F, Kajioka J, Miyamura T et al. ; Taguchi F et al., Prevalence rate and age of acquisition of antibodies against JC virus and BK virus in human sera. *Microbiol Immunol* 1982

Tong CY, Bakran A, Peiris JS et al.; The association of viral infection and chronic allograft nephropathy with graft dysfunction after renal transplantation. *Transplantation*. 2002

Traum AZ, Kawai T, Vacanti JP et al.; The need for tolerance in pediatric organ transplantation. Pediatrics. 2008

Wade AW, McDonald AT, Acott PD et al.; Human herpes virus-6 or Epstein-Barr virus infection and acute allograft rejection in pediatric kidney transplant recipients: greater risk for immunologically naive recipients. Transplantation Proceeding 1998

Waldman M, Kopp JB. Parvovirus-B19-associated complications in renal transplant recipients. Nat Clin Pract Nephrol. 2007

Waldman WJ, Knight DA, Blinder L et al.; Inhibition of cytomegalovirus in vitro and in vivo by the experimental immunosuppressive agent leflunomide. Intervirology. 1999

Walker RC, Marshall WF, Strickler JG et al.; Pretransplantation assessment of the risk of lymphoproliferative disorder. Clin Infect Dis 1995

Yoshikawa T, Suga S, Asano Y et al.; A prospective study of human herpesvirus-6 infection in renal transplantation. Transplantation 1992;

Young NS, Brown KE. Parvovirus B19. NEJM 2004