

Monitoraggio di infezione da Citomegalovirus (CMV) nel paziente sottoposto a trapianto di intestino

Giulia Nardini¹, Alberto Merighi², Nadia Nanni¹, Valeria Govi¹, Anna Maria Bartoletti¹, Concetta Calvo¹, William Gennari¹, Maria Grazia Tamassia¹, Paola Pietrosevoli¹, Anna Maria Teresa Sabbatini¹, Monica Pecorari¹

¹ Laboratorio di Virologia, Dipartimento Integrato Servizi Diagnostici e di Laboratorio e Medicina Legale Policlinico, Modena

² Gastroenterologia, Dipartimento Integrato di Medicine e Specialità Mediche, Policlinico, Modena

Monitoring of the cytomegalovirus (CMV) infection in the intestinal transplant patient

Key words: CMV reactivation, intestinal transplant patients

SUMMARY

Six intestinal transplanted patients were monitored for CMV reactivation by pp65 antigenemia. In addition, the CMV viral load of intestinal biopsies was quantified to verify on a possible clinical meaning of this viral marker in order to the organ reject. No relationship emerged between this event and high amounts of CMV genomes in intestinal tissues.

INTRODUZIONE

Negli ultimi dieci anni, il trapianto di intestino si è trasformato da complicata procedura sperimentale (2, 5, 8) ad intervento di elezione per pazienti con insufficienza intestinale allo stadio terminale e per quelli che non possono più proseguire la nutrizione parenterale totale (3, 6, 7). I successi che si sono susseguiti nel corso di questi anni hanno fatto aumentare notevolmente il numero di candidati al trapianto di intestino, spesso associato a trapianto combinato di fegato.

Numerose casistiche attestano il progressivo successo del trapianto intestinale con un 50-70% di sopravvivenza dell'organo a cinque anni dal trapianto stesso. L'inferiore percentuale di successo, rispetto al trapianto di altri organi, sembra dovuto ad una maggiore concentrazione di cellule linfoidi nel tessuto intestinale rispetto a quella degli altri organi che giocherebbe un ruolo fondamentale nel rigetto dell'organo trapiantato e nell'insorgenza della Graft-Versus-Host Disease (GVHD). La conseguente richiesta di una maggiore immunosoppressione per controllare tali conseguenze aumenta il rischio di infezioni opportunistiche (1) tra le quali occupano un posto importante le riattivazioni di virus latenti.

Nei pazienti trapiantati di intestino/multiviscerale l'infezione da CMV rappresenta una delle complicanze maggiori, risultando spesso responsabili di fenomeni di rigetto (4).

Allo scopo di stabilire il rapporto tra infezione da CMV e rigetto d'organo, 6 pazienti, sieropositivi per CMV prima del trapianto di intestino, effettuato presso il Centro Trapianti di Fegato e Multiviscerale del Policlinico di Modena nel periodo compreso tra dicembre 2000 e giugno 2003, venivano controllati per riattivazione del

virus mediante test di Antigenemia (pp65) su polimorfonucleati provenienti da sangue periferico e reazione a catena della polimerasi (PCR) eseguita su biopsie intestinali. Quando la quantità di materiale era sufficiente si procedeva alla quantificazione del DNA di CMV nelle biopsie intestinali mediante Real Time PCR per valutare l'importanza della carica virale del virus nella biopsia come marker di rigetto.

MATERIALI E METODI

Antigenemia

La ricerca dell'antigene pp65 del CMV sui polimorfonucleati (PMN) di sangue periferico veniva eseguita mediante tecnica di immunofluorescenza indiretta (IFI) utilizzando anticorpi monoclonali specifici anti pp65 (CINA pool-Argene Biosoft) ed anticorpi anti-mouse (Fluorescein Coniugated Goat FAB₂ Fragment to mouse IgG Fc-Organon Teknica Corporation). La lettura dei preparati al microscopio a fluorescenza, previa colorazione di contrasto, portava a quantificare il numero di PMN positivi su un totale di 2×10^5 cellule.

Estrazione DNA da biopsie intestinali

Per l'estrazione del DNA virale veniva utilizzata una metodica di estrazione "Salting Out" homemade (10). Le biopsie venivano sospese in 400 μ l di tampone salino (10 mM Tris-HCl pH 8.2, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA), trasferite in una provetta contenente: 10 μ l SDS 10%, 10 μ l di proteinasi K (20 mg/ml), e poste per 1 ora e 30 minuti a 56°C e poi per 10 minuti a 94°C per bloccare l'azione della proteinasi K. Aggiunti 400 μ l di NaCl 4M si otteneva una sospensione agitata per 15 secondi al vortex e centrifugata per 15 minuti a 5000 rpm per far precipitare le proteine ed i

detriti cellulari.

Al sovrantante ottenuto, trasferito in una nuova provetta, venivano aggiunti 500 µl di isopropanolo per la precipitazione dell'acido nucleico. Per facilitare la precipitazione, la provetta veniva posta a -20°C per 30 minuti. Dopo una centrifugazione a 14000 rpm per 25 minuti a 4°C, il sovrantante veniva eliminato ed il pellet lavato con 1 ml di una soluzione di etanolo al 70% per rimuovere l'eccesso di sali. Dopo centrifugazione l'etanolo veniva decantato, il pellet asciugato mediante tampone sterile e lasciato sotto cappa a flusso laminare per eliminare completamente l'etanolo.

Il DNA estratto veniva risospeso in un tampone costituito da Tris-HCl 1 mM, EDTA 0.2 mM e quantificato allo spettrofotometro.

Amplificazione

L'amplificazione del CMV DNA veniva condotta in nested PCR. I primers utilizzati (9) erano i seguenti: P5 (5' CTGTCGGTGATGGTCTCTTC 3'), P6 (5' CCCGACACGCGGAAAAGAAA 3') e P7 (5' TCTCTGGTCCTGATCGTCTT 3'), P8 (5' GTGACCTACCAACGTAGGTT 3').

Nella PCR esterna 1,5 µg di DNA venivano addizionati a 100 µM di ogni nucleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), MgCl 1.5 mM, 10 pmoli di ciascun primers senso e antisense, 1 unità di enzima termostabile Taq-polimerasi (Eppendorf s.r.l. Milano, Italia), 5 µl di tampone 10X e acqua bidistillata sterile per un totale di 50 µl. I campioni venivano sottoposti a 25 cicli di amplificazione in cui ogni ciclo includeva uno step di denaturazione a 94°C per 35 secondi, uno di annealing a 56°C per 30 secondi ed uno di estensione a 75°C per 30 secondi. I campioni venivano sottoposti ad una denaturazione iniziale di 96°C per 5 minuti e ad una estensione finale a 55°C per 2 minuti e a 72°C per 4 minuti.

Nella PCR interna, 1,5 µl del primo prodotto di amplificazione veniva addizionato con 5 µl di tampone 10X, 100 µM di ogni nucleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), MgCl 1.5 mM, 10 pmoli di ciascun primers senso e antisense, 1 unità di enzima termostabile Taq-polimerasi (Eppendorf s.r.l., Milano, Italia) e acqua bidistillata sterile per un totale di 50 µl. I campioni venivano sottoposti a 30 cicli di amplificazione in cui ogni ciclo includeva uno step di denaturazione a 94°C per 35 secondi, uno di annealing a 58°C per 30 secondi ed uno di estensione a 75°C per 15 secondi. I campioni venivano sottoposti ad una denaturazione iniziale di 96°C per 1 minuto e ad una estensione finale a 55°C per 2 minuti e a 72°C per 4 minuti. Dopo amplificazione interna 10 µl di ciascun campione venivano sottoposti a elettroforesi

su gel di agarosio al 3% colorato con bromuro d'etidio, visualizzati ai raggi UV e fotografati.

In ogni seduta di amplificazione venivano inseriti un controllo negativo, un controllo di amplificazione costituito solamente dai reagenti e acqua e un controllo positivo costituito da DNA di CMV (AD 169) estratto da coltura di fibroblasti umani infettati in laboratorio.

Controllo di qualità

Per verificare l'amplificabilità dei campioni in PCR, veniva effettuato un controllo di qualità al fine di escludere la presenza di inibitori della Taq-polimerasi e quindi di falsi negativi tra i campioni esaminati. A questo scopo, i campioni venivano sottoposti ad un ciclo di amplificazione per il gene della β-globina.

Per l'amplificazione, alla stessa quantità di DNA utilizzata per l'amplificazione di CMV DNA, veniva aggiunta una miscela costituita da 100 µM di ogni nucleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), MgCl 1.5 mM, 5 µl tampone 10X e 0.8 U di Taq-polimerasi (Eppendorf s.r.l., Milano, Italia), 10 pmoli di ciascun primers e acqua bidistillata per arrivare a 50 µl. Primers utilizzati:

BG3 (5' AACTTCATCCACGTTCCACC 3'), BG4 (5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 3').

Condizioni di amplificazione: denaturazione iniziale di 5 minuti a 96°C, 30 cicli di amplificazione costituiti ciascuno da una denaturazione a 94°C per 35 secondi, un annealing a 52°C per 30 secondi, un'estensione a 75°C per 15 secondi. I campioni venivano inoltre sottoposti ad una estensione finale di 4 minuti a 72°C. Il frammento di β-globina amplificato, in quantità di 10 µl per ogni campione, veniva visualizzato con elettroforesi in gel d'agarosio al 3% con bromuro d'etidio, visualizzati ai raggi UV e fotografati.

Quantificazione del DNA di CMV tramite PCR real time

Il DNA di CMV veniva quantificato utilizzando il kit Q-CMV (Amplimix/Ampliprobe Amplimedical, Torino, Italia) seguendo il protocollo incluso.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nella tabella 1, gli episodi di rigetto verificatesi nei 6 pazienti in esame sono posti a confronto con i risultati delle indagini virologiche mentre nella tabella 2, sono riportati i risultati positivi di uno o di entrambe le indagini in assenza di eventi clinici.

Su 19 episodi complessivi di rigetto, due, **a** e **b**, osservati rispettivamente nei pazienti n°1 e n° 2, presentano marker positivi per CMV.

Nel caso **a**, copie di CMV DNA sono presenti in un elevato numero (467 copie/10⁵ cellule) nella

biopsia intestinale alla comparsa dei primi sintomi di rigetto mentre le biopsie studiate nell'arco dei 9 giorni successivi risultano negative. Quanto allo studio dell'antigenemia, solo uno dei 4 esami, eseguiti in corrispondenza degli esami biopsici, risulta positivo per un basso numero di nuclei (3 su 2×10^5 cellule).

L'episodio di rigetto **b** è caratterizzato da alti valori di antigenemia (da 1 a 472 nuclei su 2×10^5 cellule) con negatività o basso numero di copie di CMV DNA (< 20 copie/ 10^5 cellule) nelle corrispondenti biopsie intestinali nei primi 6 giorni mentre nei 10 giorni successivi si osserva una inversione dei risultati: alla negatività del test di antigenemia corrispondono valori molto elevati di virus nelle biopsie (da 375 a 2714 copie/ 10^5 cellule).

Dall'analisi dei risultati riportati nella tabella 2 emerge una situazione interessante. I casi indicati con le lettere **c** ed **d** osservati nei pazienti n° 1 e n° 4, mostrano una situazione virologica simile a quella del caso di rigetto **a** del paziente n° 1: ad un alto numero di copie di CMV DNA nella biopsia intestinale (rispettivamente di 494 copie/ 10^5 cellule in **c** e di 451 copie/ 10^5 cellule in **d**) è associato o un basso numero di nuclei positivi (7 su 2×10^5 cellule) o negatività di nuclei nelle corrispondenti indagini di antigenemia. In nessun caso si osserva, invece, una situazione paragonabile al caso di rigetto **b** caratterizzato da alti valori di antigenemia cui solo tardivamente si associano alti valori di carica virale nelle biopsie.

Il fatto che i risultati virologici del caso di rigetto **a** siano simili a quelli dei casi **c** e **d**, pur nei limiti di una bassa casistica, suggerisce che la situazione virologica caratterizzata da alto numero di copie di CMV DNA nelle biopsie intestinali associata a negatività o bassi valori di antigenemia non correli necessariamente con una situazione di rigetto che sembra invece avvenire quando si riscontrino alti valori di antigenemia.

Così ai fini del rigetto d'organo, i soli alti valori di CMV a livello intestinale appaiono meno predittivi rispetto ai soli alti valori di antigenemia in quanto, i primi sono verosimilmente, conseguenti alla viremia originata dalla riattivazione di CMV a livello ematico.

Questa conclusione indica come nel controllo del rigetto da riattivazione di CMV, l'antigenemia si confermi uno strumento d'indagine fondamentale mentre la PCR quantitativa Real Time, eseguita su biopsia intestinale, appaia complementare all'antigenemia. È possibile che i dati riguardanti la carica virale delle biopsie intestinali possano, piuttosto, rivelarsi utili per la valutazione dello stato di salute dell'organo trapiantato a distanza di tempo.

Solo un episodio di rigetto sui 19 studiati nei 6 pazienti in esame appare quasi sicuramente associato a riattivazione di CMV. Questo suggerisce che nei soggetti trapiantati di intestino, tra le cause di rigetto ve ne siano di più importanti della riattivazione di questo virus.

Tabella 1. Rigetto d'organo e dati virologici concernenti CMV

PAZIENTI	RIGETTO ACUTO	RISULTATI TEST VIROLOGICI			
		ANTIGENEMIA		PCR SU BIOPSIA	
1	a	29.04.02	neg	29.04.02	467 copie
	LIEVE	03.05.02	neg	03.05.02	neg
	29.04.02 - 08.05.02	06.05.02	3 nuclei	06.05.03	neg
		08.05.02	neg	08.05.02	neg
	LIEVE	neg	neg	neg	neg
2	b	10.09.02	96 nuclei	30.08.02	neg
	LIEVE	13.09.02	132 nuclei	10.09.02	< 20 copie
		16.09.02	472 nuclei	13.09.02	< 20 copie
	30.08.02 - 04.10.02	20.09.02	neg	23.09.02	2714 copie
		23.09.02	1 nucleo	30.09.02	375 copie
	30.09.02	neg	neg	neg	
	LIEVE	neg	neg	neg	neg
	SEVERO	neg	neg	neg	neg
	LIEVE	neg	neg	neg	neg
	LIEVE	neg	neg	neg	neg
SEVERO	neg	neg	neg	neg	
3	LIEVE	neg	neg	neg	neg
4	LIEVE	neg	neg	neg	neg
	LIEVE	neg	neg	neg	neg
5	LIEVE	neg	neg	neg	neg
	LIEVE	neg	neg	neg	neg
	LIEVE	neg	neg	neg	neg
	LIEVE	neg	neg	neg	neg
6	LIEVE	neg	neg	neg	neg
	LIEVE	neg	neg	neg	neg
	LIEVE	neg	neg	neg	neg

Tabella 2. Dati virologici concernenti CMV in assenza di manifestazioni cliniche

PAZIENTI	RISULTATI TEST VIROLOGICI		
	ANTIGENEMIA	PCR su BIOPSIA	
1	c 7 nuclei	494 copie	No eventi clinici
	l nucleo	nd	No eventi clinici
	neg	< 20 copie	No eventi clinici
3	l nucleo	nd	No eventi clinici
	6 nuclei	nd	No eventi clinici
4	neg	pos ^x	No eventi clinici
	d neg	451 copie	No eventi clinici
	neg	Pos	No eventi clinici
5	4 nuclei	nd	No eventi clinici
	neg	< 20 copie	No eventi clinici
	neg	< 20 copie	No eventi clinici
6	2 nuclei	nd	No eventi clinici
	l nucleo	nd	No eventi clinici
	l nucleo	nd	No eventi clinici
	neg	< 20 copie	No eventi clinici
	neg	66 copie	No eventi clinici
	neg	< 20 copie	No eventi clinici
	neg	< 20 copie	No eventi clinici

nd = campione non disponibile

x = materiale insufficiente per la quantificazione

BIBLIOGRAFIA

1. Abu-Elmagd K, Reyes J, Fung JJ, et al. Evolution of clinical Intestinal Transplantation: improved outcome and cost effectiveness. *Transpl proc* 1999; 31: 582.
2. Alican F, Hardy JD, et al. Intestinal transplantation: laboratory experience and report of clinical case. *American Journal of Surgery* 1971; 121: 150-9.
3. David A, Gerber B, Intestinal transplantation. *Medscape transplantation*.
4. Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ transplant recipient. *New England Journal of Medicine* 1998; 338(24): 1741-51.
5. Fortner JG, Sichuk G, Litwin SD, et al. Immunological responses to an intestinal allograft with HLA-identical donor-recipient. *Transplantation* 1972; 14: 531-5.
6. Grant D. On behalf of the Intestinal Transplant Registry. Intestinal transplantation: 1997 Report of the International Registry. *Transplantation* 1999; 67(7): 1061-4.
7. Mittal NK, Kato T, Thompson JF. Current Indication for intestinal transplantation. *Current Opinion. Transplantation* 2000; 5: 279-83.
8. Olivieri CL, Rettori R, et al. Homotransplantation orthotopique de l'intestin grele et des colon droit et transverse chez l'homme. *J Chir (France)* 1969; 98: 323-30.
9. Rawal BK, Booth JC, Fernando S, Butcher PD, Powles RL. Quantification of CMV DNA in blood specimens from bone marrow transplant recipients by polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1994; 47: 189-202.
10. Zazzi M, Catucci M, De Milito A, et al. Zidovudine resistance mutations and human immunodeficiency virus type 1 DNA burden: longitudinal evaluation of six patients under treatment. *Infection* 1996; 24: 419-25.

Monica Pecorari

Laboratorio di Virologia
 Dipartimento Integrato dei Servizi
 Diagnostici e di Laboratorio
 e di Medicina Legale
 Policlinico di Modena
 Via del Pozzo, 71 - 41100 Modena ITALY
 Tel. +39 059 4223758 - Fax. +39 059 4223625
 E-mail: pecorari.monica@policlinico.mo.it