

# CMV DNA e MRNA Pp67 nel monitoraggio del paziente sottoposto a trapianto di midollo osseo

**Maria Bonaria Goffi**

*Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, Ospedale "R. Binaghi" Asl N. 8 Cagliari*

## Cytomegalovirus (CMV) after bone marrow transplantation

### SUMMARY

Primary infection of immunocompetent individuals does not lead to complication, but CMV is a major clinical problem in transplant recipients. Thus, it is important to use sensitive and specific diagnostic techniques to rapidly and accurately detect CMV infection and identify patients at risk of developing CMV disease.

In the present study, CMV infection after bone marrow transplantation was monitored by two molecular biology assays: COBAS AMPLICOR CMV MONITOR and NUCLISENS CMV m-RNA pp67.

CMV m-RNApp67 assay was found to show positivity later than CMV-DNA MONITOR.

The increment of number of copies/ml agreed with the clinical symptoms of CMV infection. The quantitative results of the CMV MONITOR assay was more helpful to select an antiviral strategy than the qualitative results of NUCLISENS m-RNA pp67 assay.

### INTRODUZIONE

Il trapianto di organi solidi e di cellule staminali è diventato un trattamento vitale di molte malattie considerate precedentemente fatali (nel 1999 sono stati eseguiti 21516 trapianti di organi solidi negli Stati Uniti) (10).

L'uso di agenti immunosoppressivi è essenziale nel post trapianto, tuttavia l'uso di questi farmaci espone il ricevente ad un alto rischio di infezioni opportunistiche.

L'infezione da Citomegalovirus (CMV), virus ubiquitario appartenente alla famiglia dei BetaHerpesvirus, o la riattivazione del virus stesso, rappresentano il rischio maggiore e allo stesso tempo più comune (8) per il paziente trapiantato. Gli effetti deleteri dell'infezione da CMV nei pazienti riceventi derivano dall'invasione diretta di vari organi (polmoniti, enterocoliti, encefaliti o retiniti) cui segue poi una disseminazione del virus nel sangue (viremia). Le forme più serie di infezione da CMV si riscontrano nei riceventi sieronegativi per CMV da donatori CMV sieropositivi (11).

Come è noto esistono protocolli ormai consolidati che suggeriscono un trattamento preventivo dell'infezione da CMV nei pazienti sottoposti a trapianto di organi solidi, trattamento che consiste nella somministrazione endovenosa di Ganciclovir e che tiene conto del livello di replicazione virale.

Nei pazienti sottoposti a trapianto di midollo viene anche usato un trattamento con immunoglobuline.

Le strategie miranti alla prevenzione dell'infezione da CMV prevedono anche l'uso di una terapia

preemptiva guidata dalla determinazione della CMV viremia (1, 4, 7).

Tuttavia la malattia da CMV ancora si manifesta particolarmente nei pazienti sottoposti a trapianto di midollo che sviluppano Graft versus host disease (GVHD) o che vengono sottoposti a profilassi antivirale prolungata durante l'immediato periodo post trapianto (6).

Da quanto esposto è evidente come i miglioramenti tecnologici della diagnostica virologica siano di estrema importanza e costituiscano un valido aiuto ai fini del successo nella prevenzione dell'infezione da CMV; in particolare l'introduzione della determinazione quantitativa del CMV-DNA ha contribuito maggiormente a tale successo soprattutto per ciò che riguarda la possibilità da parte del clinico di modulare la terapia in base ai dati di laboratorio

### MATERIALI E METODI

Già da tempo nel nostro Laboratorio è stata introdotta in routine una metodica per la determinazione quantitativa del CMV-DNA previa PCR su plasma "COBAS AMPLICOR CMV MONITOR", (Roche Diagnostics, Pleasanton, California).

La metodica prevede l'amplificazione di un segmento del gene CMV DNA polimerasi UL54, è una metodica standardizzata, la fase di amplificazione è completamente automatizzata in un sistema chiuso, i risultati vengono espressi in copie/ml, il limite di sensibilità inferiore del test è di 400 copie/ml.

Non esiste un valore limite standardizzato per tutte le metodiche ma si può certamente affermare che la soglia di 400 copie/ml predice la possi-

bilità di malattia da CMV se il paziente non viene trattato (3, 13).

Recenti lavori hanno posto l'attenzione su un'indagine molecolare alternativa al CMV-DNA, si tratta della determinazione qualitativa dell'RNA messaggero della proteina pp67 "NUCLISENS mRNA pp67" (Organon Teknika Diagnostics, Boxtel, Netherlands). La metodica prevede una reazione di amplificazione isoterma e determina, appunto, la presenza dell'RNA messaggero (9) che codifica per la proteina pp67 del tegumento ed è trascritta dal gene UL65. Questo gene è espresso solo durante un episodio di infezione attiva, quando, cioè, si ha replicazione del virus. Esistono diversi studi retrospettivi che confrontano questa metodica con altri test diagnostici (5); la metodica offre indubbiamente diversi vantaggi che sono, per esempio, la stabilità del campione in lysis buffer, il minimo volume di sangue (100 µl) che la rende utile anche in pediatria, la possibilità di riutilizzare i reagenti entro due settimane, la possibilità di automatizzare la fase di estrazione e di rivelazione.

Da un certo punto di vista il test non sembra mostrare la massima sensibilità ma, d'altra parte, studi comparativi indicano che il test ha il massimo valore predittivo positivo di malattia (2, 12, 14).

Per gestire la malattia da CMV è molto importante utilizzare un test che aiuti il clinico nel monitoraggio del trattamento antivirale. In certe situazioni l'antigenemia e i livelli di DNA tendono a diminuire lentamente per la natura biologica stessa delle molecole corrispondenti. Poichè l'mRNA ha un'emivita *in vivo* assai breve, dovrebbe sparire rapidamente non appena la terapia ha il suo effetto.

Non è stato, per il momento, possibile verificare i tempi di ritorno ai valori negativi del test m-RNA pp67 nel corso dei due monitoraggi ma ciò potrebbe comunque essere motivo di indagini future.

## RISULTATI

Per circa nove mesi consecutivi il nostro laboratorio ha eseguito contemporaneamente le due metodiche, COBAS AMPLICOR CMV MONITOR e NUCLISENS mRNA<sub>pp67</sub> su pazienti trapiantati presso il Centro Trapianti Midollo Osseo del nostro Ospedale.

Sono state eseguite 176 determinazioni contemporanee con le due metodiche durante il monitoraggio dei pazienti: 151 campioni sono risultati negativi con entrambe le metodiche, 11 sono risultati concordemente positivi, 13 positivi per CMV DNA e negativi per mRNA<sub>pp67</sub>, solo un campione è risultato positivo per mRNA<sub>pp67</sub> e negativo (borderline) per CMV DNA (tabella 1). Appare significativo esporre il caso di due pazienti che, sottoposti a trapianto allogenico di midollo da donatore non correlato, hanno iniziato il monitoraggio a circa due giorni dal trapianto e che sono stati osservati per un periodo di circa due mesi con dodici prelievi (tabella 2 - tabella 3).

In entrambe i trapianti donatore e ricevente erano sieropositivi per CMV IgG.

Come si può osservare dai dati riportati in tabella, il test del CMV DNA che all'inizio del monitoraggio era negativo si è positivizzato, in entrambe i pazienti, prima del test RNA<sub>m</sub> pp67.

La positività del test era accompagnata dall'insorgenza di una sintomatologia clinica non certo trascurabile che veniva imputata in tutti e due i casi proprio all'infezione da CMV.

Per quanto riguarda la terapia possiamo osservare come nel Paziente 1 il numero di copie è andato

Tabella 1.

CMV-DNA PCR	RNA <sub>m</sub> pp67	CAMPIONI
-	-	151
+	+	11
+	-	13
-	+	1
<b>TOTALE CAMPIONI</b>		<b>176</b>

Tabella 2. Paziente 1

GIORNO*	CMV DNA	RNA <sub>m</sub> pp67	SINTOMATOLOGIA CLINICA	TERAPIA
-7	Negativo	Negativo		PROFILASSI CON FOSCAVIR A BASSO DOSAGGIO TERAPIA IMMUNOSOPPRESSIVA
0	Negativo	Negativo		
+7	Negativo	Negativo	LIEVE GVHD CUTANEA	
+14	Negativo	Negativo		
+21	Negativo	Negativo	ESTENSIONE GVHD CUTANEA	FOSCAVIR A DOSAGGIO PIÙ ELEVATO - CYTOTEC (immunoglobuline)
+28	Positivo 3440	Negativo	Febbre- Grave GVH cutanea-dolori addominali -crampi - vomito- diarrea	
+35	Positivo 4850	Negativo		
+39	Positivo 12000	Negativo		SOSPENSIONE DEL FOSCAVIR- INIZIO CON CYMEVENE
+42	Positivo 11600	Positivo	Progressivo miglioramento della sintomatologia intestinale	
+45	Positivo 11800	Positivo		
+47	Positivo 5650	Positivo		
+50	Positivo 1950	Positivo	GVHD EPATICA	

**Tabella 3.** Paziente 2

GIORNO*	CMV DNA	RNA m pp67	SINTOMATOLOGIA CLINICA	TERAPIA
-3	Negativo	Negativo		
+5	Negativo	Negativo		
+12	Negativo	Negativo	LIEVE GVHD CUTANEA (1° grado)	
+19	Negativo	Negativo		
+26	Negativo	Negativo	Miglioramento GVHD cutanea	
+33	Negativo	Negativo	Dimissione dal Reparto	
+40	Borderline	Negativo	Diarrea – stranguria – pollachiuria GVHD assente	CYMEVENE per 2 gg.
+44	Positivo 17200	Negativo		Sospensione CYMEVENE
+47	Positivo 91800	Positivo		CYMEVENE
+54	Positivo 15400	Positivo		CYTOTEC (immunoglobuline)
+57	Positivo 57000	Positivo		
+61	Positivo 47500	Positivo	Miglioramento della sintomatologia clinica	FOSCAVIR + VISTIDE
+70	Positivo 2000			

(\*) GIORNI DAL TRAPIANTO

diminuendo quando si è passati dalla terapia con Foscavir a quella con Cymevene con un conseguente miglioramento della sintomatologia clinica.

Nel caso del Paziente 2 che evidentemente non ha risposto alla terapia con Cymevene, si assiste ad un miglioramento delle condizioni cliniche e alla sostanziale diminuzione del numero di copie/ml di DNA solo dopo il passaggio all'associazione di Foscavir e Vistide.

Alla luce dei risultati ottenuti ci sembra di poter concludere che il dato quantitativo del CMV DNA costituisca un valido aiuto per il clinico nel monitoraggio del paziente sottoposto a trapianto di midollo e che non ci siano elementi sufficienti, dal punto di vista diagnostico, per sostituire a questa metodica quella della determinazione dell'RNAm pp67.

### RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano la sig.ra Franca Nurcis e il Sig. Antonio Ritano per la preziosa collaborazione.

### BIBLIOGRAFIA

- Gane E, Saliba F, Valdecasas GJ, et al. Randomised trial of efficacy and safety of oral ganciclovir in the prevention of Cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. *Lancet* 1998; 351: 454.
- Goffi MB, Satta G. Monitoraggio dell'infezione da CMV nei pazienti trapiantati. *Il Patologo Clinico* 2002; 1-2: 30-32.
- Griffiths PD, Witley RJ. The challenge of CMV infection and disease transplantation. Cambridge Medical Publication, Worthing, United Kingdom. <http://www.ihmf.org>.
- Lowance D, Neumayer HH, Legendre CM, et al. Valacyclovir for the prevention of Cytomegalovirus disease after renal transplantation. *N Engl J Med* 1999; 340: 1462-70.
- Middeldorp JM, Sillekens P, Lunenberg J. Organs and Tissues. 2000; 2: 99-107.

- Nguyen Q, Champlin R, Giralt S, et al. Late Cytomegalovirus pneumonia in adult allogeneic blood and marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 618-23.
- Patel R, Snyderman DR, Rubin RH, et al. Cytomegalovirus prophylaxis in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 1996; 61: 1279-89.
- Paya CV. Indirect effects of CMV in the solid organ transplant patient. *Transpl Infect Dis* 1999; 1: 8-12.
- Pellegrin I, Griguer I, Ekouevi D, et al. New molecular assays to predict occurrence Cytomegalovirus disease in renal transplant recipients. *J Infect Dis* 2000; 182: 36-42.
- Razonable RR, Paya CV, Smith TF. Role of the laboratory in diagnosis and management of Cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 746-52.
- Razonable RR, Rivero A, Rodriguez A, et al. Allograft rejection predicts the occurrence of late-onset Cytomegalovirus disease among CNV mismatched solid organ transplant recipients receiving prophylaxis with oral ganciclovir. *J Infect Dis* 2001; 184: 1461-4.
- Schliefer K, Kupfer B, Rockstroh JK, et al. Importance of pp67m-RNA detection and CMV-DNA quantification in HIV-infected patients. *J Clin Virol* 1999; 12: 104.
- Sia IG, Wilson JA, Groettum CM, et al. Cytomegalovirus DNA load predicts relapsing CMV infection after solid organ transplantation. *J Infect Dis* 2000; 181: 717-20.
- Zhang F, Tetali S, Wang XP, et al. Detection of Cytomegalovirus pp67 Late Gene Transcripts in Cerebrospinal Fluid of Human Immunodeficiency virus type 1-infected by nucleic acid sequence-based amplification. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1920-5.

#### Maria Bonaria Goffi

Laboratorio Analisi Ospedale Binaghi  
Via Is. Guadazzonis  
09100 Cagliari  
Tel.: 070 6093113-3115