

## **Progetto di ricerca:**

**LA MISURA DELLA VIREMIA DI TORQUETENOVIRUS (TTV) COME MARCATORE PREDITTIVO DEL RISCHIO DI COMPLICANZE INFETTIVE E DI RIGETTO NEL PAZIENTE TRAPIANTATO DI ORGANO SOLIDO**

**Acronimo: PREVIR**

## **Proponente:**

Prof. Fabrizio Maggi, Dipartimento di Ricerca Traslazionale, Università di Pisa e UOC Virologia Universitaria, AOUP, Via Paradisa 2, 56100 Pisa. Tel.: 050993756; cell. 3480301436; email: [fabrizio.maggi@unipi.it](mailto:fabrizio.maggi@unipi.it)

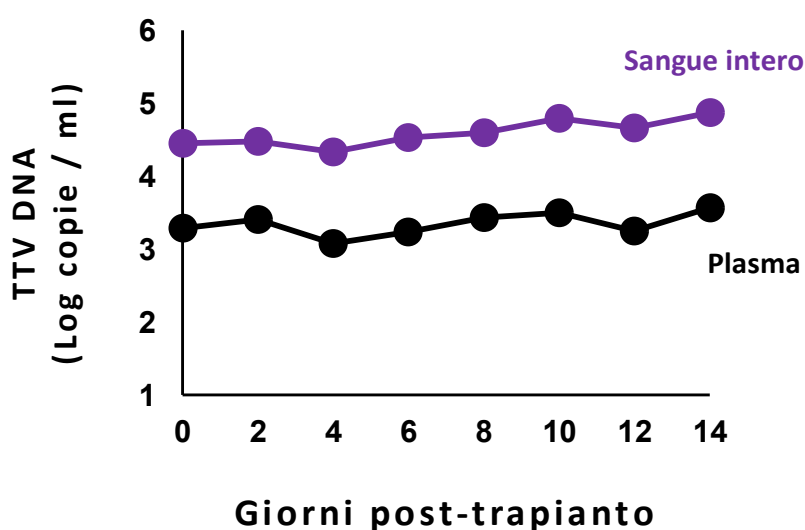
## **Relazione finale:**

In questo anno di progetto sono state condotte tutte le attività di ricerca proposte e volte a descrivere la cinetica della viremia di torquetenovirus (TTV) in pazienti sottoposti a trapianto di fegato. Lo studio ha conseguito i seguenti risultati.

- 1) **Allestimento di una Biobanca di materiali biologici provenienti da pazienti sottoposti a trapianto di fegato.** La Biobanca risulta costituita da:
  - a) *campioni di sangue*: ad oggi (novembre 2019) la Biobanca custodisce oltre 4300 campioni di sangue, suddivisi per metà in campioni di plasma e per l'altra metà in campioni di sangue intero. I campioni derivano dai 94 pazienti fin qui arruolati dal Reparto di Chirurgia dei Trapianti dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana (AOUP), da ciascuno dei quali sono stati ottenuti in media, fra pre- e post-trapianto, circa 23 campioni. I campioni conservati a -80° derivano da materiale di scarto, residuale alla normale routine diagnostica eseguita presso il Laboratorio dei Trapianti dell'AOUP, e sono stati resi anonimi prima della loro conservazione. Il tutto in ottemperanza a quanto deliberato dal Comitato Etico di Area Vasta Nord Ovest (protocollo n. 63409).
  - b) *Estratti di DNA*: ad oggi (novembre 2019) la Biobanca custodisce oltre 2300 DNA estratti da plasma (n. 1150) e da sangue intero (n. 1150) ottenuti dai 50 pazienti fin qui valutati per la presenza e la quantificazione di TTV. Gli estratti sono conservati in aliquote a -80°C.

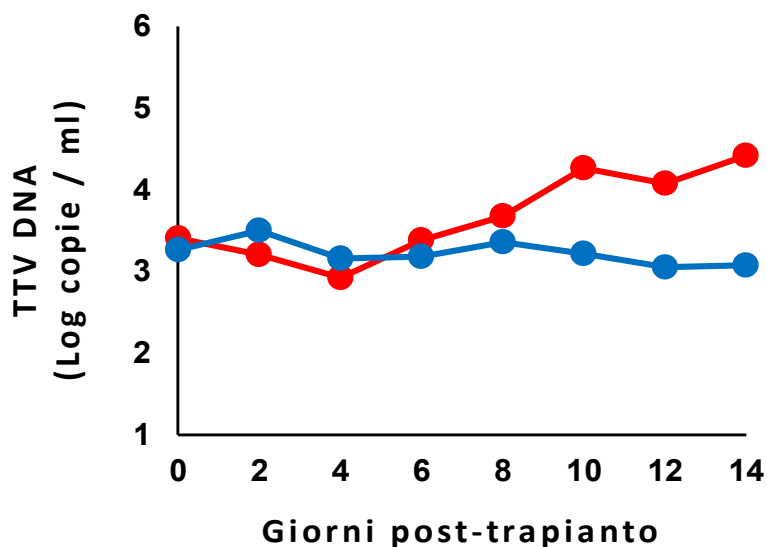
## 2) Studio della cinetica di TTV nelle prime due settimane post-trapianto:

la cinetica di TTV nel breve periodo post-trapianto (14 giorni) è stata valutata in 50 pazienti. Da ciascun paziente è stato ottenuto un prelievo prima del trapianto (basale) e prelievi nei giorni 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 post-trapianto. In totale sono stati esaminati per TTV circa 800 campioni, 400 di plasma e 400 di sangue intero. Le dinamiche della viremia di TTV nel plasma e nel sangue intero nei primi 14 giorni post-trapianto sono mostrate in **Figura 1**.



Come evidente, i livelli medi di TTV misurati nel plasma risultano inferiori (di circa 1 Log) rispetto a quelli rilevati nel sangue intero e questa differenza, evidenziata già nel prelievo pre-trapianto, rimane immutata e confermata per tutto il periodo di osservazione post-trapianto. La cinetica della viremia media appare estremamente stabile nei primi 14 giorni post-trapianto, non subisce significative variazioni e risulta altamente sovrapponibile fra plasma e sangue intero. Sebbene questo andamento della viremia di TTV caratterizzi la maggior parte dei pazienti esaminati (86%), un certo numero di soggetti (14%) mostra già un incremento significativo della viremia prima del 14° giorno post-trapianto (in media di +1,2 Log rispetto al valore basale), lasciando intravedere l'esistenza di una diversa capacità replicativa del virus fra i vari pazienti fin dai primi giorni dal trapianto. **Figura 2** evidenzia la cinetica di TTV nel plasma di pazienti che sperimentano un significativo incremento della viremia (linea rossa), rispetto a quelli con viremia stabile (linea azzurra). E' interessante notare come la viremia nei due gruppi di pazienti sia assolutamente comparabile fino al giorno 8 post-trapianto, come la prima significativa differenza appaia al giorno

10 e come questa differenza si mantenga costante fino al giorno 14. Lo stesso andamento fra i due gruppi si evidenzia anche quando la viremia di TTV è misurata nel sangue intero (dato non mostrato).



### 3) Studio della cinetica di TTV nel follow-up post-trapianto:

i 50 pazienti fin qui arruolati sono stati monitorati per TTV fino ad un massimo di 90 giorni post-trapianto. Dopo il 14° giorno, prelievi da ogni paziente sono stati ottenuti ai giorni 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 di follow-up post-trapianto. Il monitoraggio di TTV è stato condotto su plasma e su sangue intero (**Figura 3**).

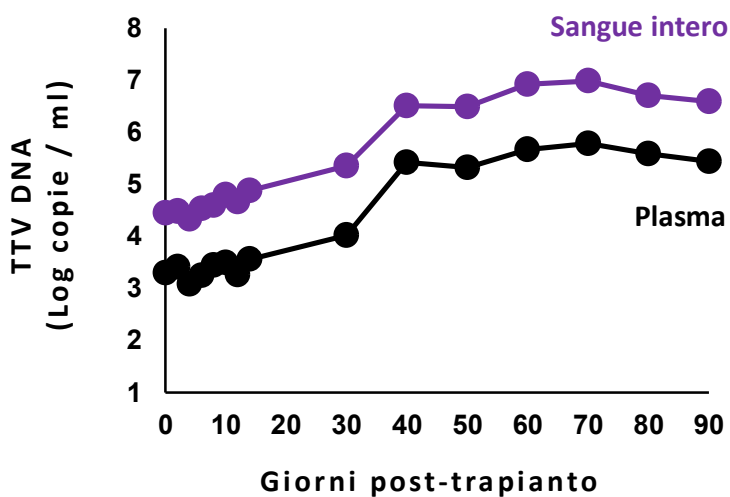
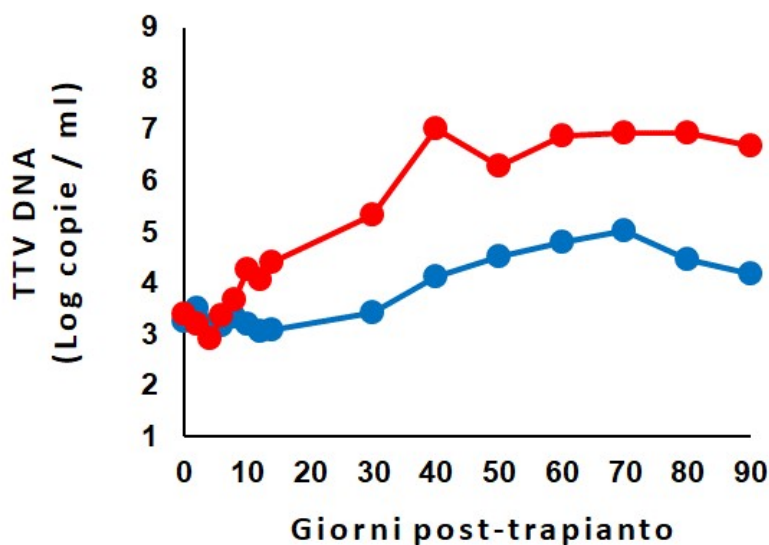


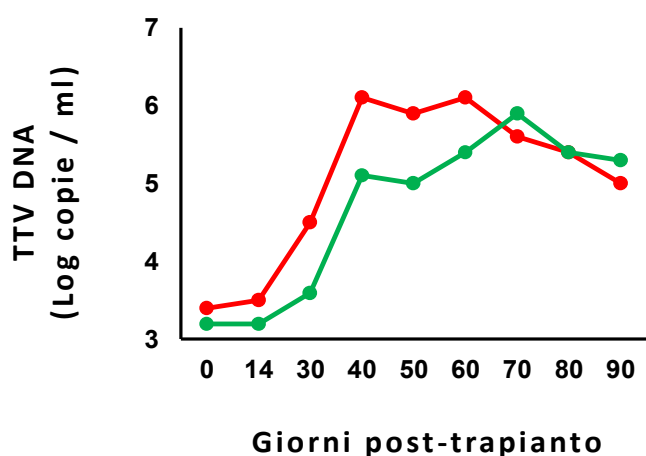
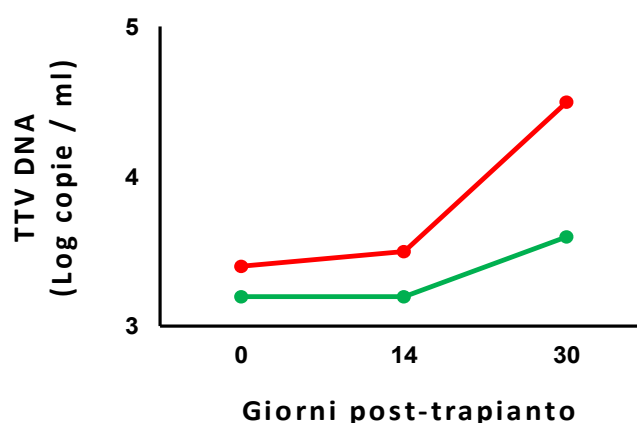
Figura 3 mostra l'andamento medio della viremia di TTV nel periodo di osservazione di 3 mesi. Come già evidenziato nei primi 14 giorni post-trapianto, la viremia di TTV nel sangue intero risulta più elevata di circa 1 Log rispetto a quella misurata nel plasma e tale differenza si mantiene costante per tutto il periodo di osservazione. La cinetica virale risulta sovrapponibile nei due tipi di campione, manifestando un costante e solido parallelismo. Come mostrato, dopo i primi 14 giorni in cui l'andamento medio di TTV risulta stabile, si assiste ad una fase di incremento rapido della viremia che culmina al giorno 40 post-trapianto. Tale fase esponenziale sembra poter essere suddivisa in due diversi periodi: il primo di minor incremento fra il 14° e il 30° giorno ed un secondo più rapido e significativo aumento della viremia fra il giorno 30 e il giorno 40 post-trapianto. Dal giorno 40 in poi, la viremia si mantiene relativamente costante fino al giorno 90, su livelli di 2-3 Log più elevati rispetto al valore basale.

Sulla base della cinetica descritta e come mostrato in **Figura 4**, è stato possibile individuare due differenti comportamenti nella popolazione di pazienti esaminati: a) un gruppo più numeroso di pazienti con un andamento di TTV stabile fino al giorno 30 post-trapianto e un incremento che si manifesta dal giorno 40 in poi (linea azzurra); b) un gruppo meno numeroso di pazienti con un significativo incremento della viremia di TTV entro i primi 30 giorni post-trapianto (linea rossa). Lo stesso andamento, ma con titoli del virus più elevati, è dimostrabile anche usando il sangue intero come matrice biologica (dato non mostrato).



#### 4) Studio della cinetica di TTV in relazione alle complicanze infettive post-trapianto:

il 41% dei pazienti esaminati manifestava una complicanza infettiva entro i 3 mesi di osservazione. Nella maggior parte dei casi la complicanza risultava in una riattivazione virale, in particolare da virus di Epstein-Barr e/o citomegalovirus, o in qualche caso dalla comparsa di un'infezione batterica. Per verificare l'ipotesi che la viremia di TTV possa essere considerata un marker predittivo della comparsa di complicanze infettive post-trapianto, le cinetiche virali dei pazienti con riattivazione virale e/o infezione batterica sono state confrontate con quelle ottenute da pazienti che non hanno manifestato complicanze. L'andamento di TTV nei due gruppi di soggetti (linea rossa: pazienti con complicanze infettive; linea verde: pazienti senza complicanze infettive) è mostrato nei primi 30 giorni post-trapianto (**Figura 5**) e per tutti i 3 mesi di osservazione (**Figura 6**).



Come evidente dalle figure, la prima differenza fra i due gruppi di pazienti risulta nei livelli di viremia di TTV. Questi infatti, fin dal dosaggio basale, appaiono generalmente più elevati nei

pazienti con complicanze infettive e tali si mantengono almeno per i primi 2 mesi di osservazione, con differenze che raggiungono valori significativi (superiori ad 1 Log) fra il giorno 30 e 60 post-trapianto. Evidente è anche la differenza nelle cinetiche di TTV fra i due gruppi di pazienti. I soggetti che sviluppano complicanze infettive mostrano un primo significativo incremento della viremia di TTV al giorno 30, quando è dosabile un numero di copie del virus superiore di almeno 1 Log rispetto al valore basale. La viremia raggiunge il picco al giorno 40, rimane stabile per circa 20 giorni e mostra poi un calo fino al giorno 90. Nei pazienti senza complicanze infettive la curva della cinetica di TTV è diversa: il primo aumento significativo della viremia si osserva dopo 40 giorni post-trapianto (con un ritardo di circa 10 giorni rispetto all'altro gruppo di pazienti), il picco si ha al giorno 70 e solo da questo momento comincia il calo dei livelli di TTV.

## **5) Correlazione fra livelli di TTV e concentrazione di farmaci immunosoppressori:**

tutti i pazienti dello studio hanno ricevuto, dopo il trapianto, una terapia immunosoppressiva basata sulla somministrazione di tacrolimus, la cui concentrazione plasmatica è stata regolarmente dosata. In totale sono stati effettuati oltre 450 dosaggi di tacrolimus ed è stata rilevata una concentrazione media del farmaco di 6,5 ng/ml (range: 0,1-21,7 ng/ml). Per valutare se la concentrazione plasmatica di tacrolimus fosse associata alla carica di TTV, è stata condotta una analisi di correlazione utilizzando metodi statistici non-parametrici. Dall'analisi non è emersa alcuna significativa correlazione fra i due parametri (dati non mostrati).

**Conclusioni:** i risultati ottenuti con questo progetto hanno contribuito ad ampliare le conoscenze sulle dinamiche della viremia di TTV in pazienti sottoposti a trapianto di fegato. Il primo importante contributo del lavoro è la definizione della cinetica di TTV nel brevissimo periodo (entro le due settimane) post-trapianto. Tale cinetica, fin qui mai studiata, mostra in media una relativa stabilità dei livelli di TTV, a differenza di quanto accade in altre tipologia di trapianto di organo solido (es. rene). Tuttavia, già in questo primissimo periodo, alcuni pazienti mostrano un comportamento diverso, esibendo da subito (in particolare dal giorno 10 post-trapianto) un significativo incremento della viremia di TTV rispetto al valore basale. Lo studio della cinetica di TTV in periodo più lunghi di osservazione mostra come il comportamento dei pazienti risulti differente in termini di incremento della loro viremia. A fronte di alcuni soggetti che, come detto,

mostrano tale incremento fin dal 10° giorno, altri lo manifestano entro il 30° giorno mentre la maggior parte evidenzia una maggiore attività replicativa di TTV solo a partire dal giorno 40 post-trapianto. Se tali differenze nelle cinetiche virali siano correlate a differenze nell'evenienza di complicanze post-trapianto (infettive, di rigetto, di sviluppo di neoplasie) potrà essere dimostrato soltanto esaminando un numero maggiore di soggetti seguiti per un periodo di follow-up più lungo. Risulta comunque particolarmente interessante la dimostrazione fatta in questo studio dell'esistenza di una significativa differenza fra le cinetiche di TTV osservate in pazienti che sviluppano complicanze infettive rispetto a quelle di pazienti esenti da queste complicanze. Risultato questo che sembra rafforzare il ruolo di TTV come utile marcatore predittivo di complicanze post-trapianto. Altri risultati dello studio risultano estremamente interessanti: 1. la mancata correlazione fra concentrazione di tacrolimus e livelli di TTV, che rafforza il concetto di come il dosaggio di questo farmaco non possa essere considerato un parametro utile per monitorare lo stato di immunodepressione del soggetto trapiantato; 2. la dimostrazione che, fatto salvo un diverso valore di viremia, l'uso di plasma e/o sangue intero per la misura di TTV nei pazienti trapiantati mostra le stesse cinetiche offrendo quindi le stesse garanzie di monitoraggio; 3. la creazione di una biobanca che, fornita di un notevole numero di prelievi pre e post-trapianto ottenuti da un elevato numero di pazienti, potrà risultare particolarmente utile per studi e ricerche future su TTV e altri potenziali marcatori biologici.

#### **Produzione scientifica:**

1. Focosi D, Spezia PG, Macera L, Salvadori S, Navarro D, Lanza M, Antonelli G, Pistello M, **Maggi F.** *Assessment of prevalence and load of torquetenovirus viremia in a large cohort of healthy blood donors.* Clinical Microbiology and Infection, in revision.
2. Macera L, Spezia PG, Focosi D, Mazzetti P, Antonelli G, Pistello M, **Maggi F.** *Lack of Marseillevirus DNA in immunocompetent and immunocompromised Italian patients.* Journal of Medical Virology, 2019 Sep 9. doi: 10.1002/jmv.25592

Pisa, 5 dicembre 2019

Prof. Fabrizio Maggi

