

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 Translazionale, Università di Pisa e UOC Virologia Universitaria, AOUP, Via Paradisa 2, 56100 Pisa. Tel.: 050993756; cell. 3480301436; email: fabrizio.maggi@unipi.it

Abstract. Il trapianto di organo solido è sempre più una terapia consolidata per molte malattie d'organo in fase terminale. I miglioramenti delle tecniche chirurgiche e l'evoluzione della terapia immunosoppressiva hanno migliorato di molto i tassi di sopravvivenza ma le complicanze post-trapianto di natura infettiva ed immunologica continuano a causare morbilità e mortalità in questi pazienti. Ad oggi, non esiste alcun parametro biologico che possa essere utilizzato come marcatore predittivo della comparsa di complicanze e/o per definire lo status di funzionalità del sistema immune nel paziente trapiantato. Tutti i parametri fin qui proposti sono laboriosi da ottenere e devono necessariamente essere combinati fra di loro anche solo per dare informazioni parziali. La recente scoperta che Torquetenovirus (TTV), un virus orfano con prevalenza del 90-100% nell'uomo, replica in stretta correlazione con la funzione immuno-mediata dell'ospite infettato, ne suggerisce l'uso nei pazienti trapiantati come sensibile, oggettivo ed affidabile indicatore della funzionalità del sistema immunitario e quindi della comparsa di complicanze a medio e lungo termine (infezioni e/o rigetto). Scopo di questo progetto è studiare la cinetica della viremia di TTV nelle prime settimane post-trapianto e identificare i livelli del virus che consentano una precisa predizione delle complicanze infettive e immunologiche. Il goal è lo sviluppo di algoritmo e/o uno score della viremia di TTV che possa essere applicato dal clinico per monitorare e modulare la terapia immunosoppressiva di induzione e di mantenimento nel paziente trapiantato.

Background. Il rapido progredire delle tecniche molecolari in virologia ha portato alla identificazione di un vasto ed eterogeneo gruppo di virus dell'uomo e di molti animali. Questi agenti, genericamente indicati col termine Anellovirus (AV), possiedono un genoma circolare a singolo filamento di DNA e un'estrema variabilità genetica che li rende molto divergenti fra loro nelle sequenze nucleotidiche e aminoacidiche. Nell'uomo sono di frequente riscontro sotto forma di infezioni croniche senza apparente malattia. Torquetenovirus (dal latino *torques*, collana e *tenuis*, sottile; TTV) è stato il primo AV identificato, nel 1997, nel sangue di un paziente giapponese affetto da epatite post-trasfusionale di origine sconosciuta. I molti isolati noti del virus sono classificati in generi diversi a seconda della specie animale infettata, quelli dell'uomo sono distinti in almeno 29 specie. Il DNA di TTV è costituito per due terzi da una regione codificante (due i geni principali codificanti per proteine strutturali e non) e per un terzo da una regione non tradotta (UTR), altamente conservata fra le diverse specie del virus e ritenuta fondamentale per la replicazione. TTV infetta le cellule utilizzando un recettore ancora sconosciuto e replica con molta probabilità all'interno del nucleo utilizzando enzimi di origine cellulare. La liberazione del virus dalla cellula ha forse come conseguenza la lisi, anche se altre modalità di rilascio non sono escluse (esempio attraverso esosomi). La storia naturale dell'infezione da TTV è poco conosciuta, ma la persistenza è l'esito più comune, verificandosi in più dell'80-90% dei soggetti infettati. Il virus penetra nell'ospite attraverso molteplici porte d'ingresso (il tratto respiratorio, il sistema gastrointestinale, l'apparato genitale, la placenta) e dopo poche settimane è rilevabile nel sangue. La viremia persiste a lungo nel tempo, spesso per sempre, con cariche virali che variano da individuo a individuo fra 10^1 e 10^9 genomi di TTV per ml di sangue e si mantengono stabili o subiscono ampie fluttuazioni associate soprattutto a situazioni di alterata funzionalità del sistema immunitario dell'ospite (es. per assunzione di farmaci immunosoppressori, terapie oncologiche, trapianti di organo solido e/o di midollo). Il virus è presente in molti tessuti e fluidi dell'ospite, dove spesso si riscontra sotto forma di infezioni miste, sostenute da molteplici specie virali. La replicazione del virus avviene probabilmente in molti tessuti (il sito più importante è considerato quello delle cellule ematopoietiche ma anche l'apparato respiratorio, il fegato e il midollo osseo) e con cinetiche molto rapide paragonabili a quelle di altri virus persistenti (es. HBV, HCV, HIV). A distanza di anni dalla sua scoperta, TTV è ancora un virus "orfano di patologia", più recentemente è stato dimostrato essere il maggior componente del viroma, quell'ecosistema di virus che colonizza il corpo umano,

spesso senza causare danno ma anzi contribuendo alla normale omeostasi dell'ospite. Il solo approccio utilizzabile per la diagnosi d'infezione da TTV è la ricerca del DNA virale con metodi molecolari d'amplificazione (PCR o real-time PCR). Tuttavia, in considerazione dell'elevata prevalenza del virus, il riscontro della sola presenza di TTV nel sangue o in altri campioni ha scarsa utilità diagnostica. Più utile è quantificare il virus presente e determinare il tipo infettante. I saggi molecolari oggi più usati per quantificare TTV sono disegnati su un segmento altamente conservato dell'UTR virale e consentono l'amplificazione di tutti gli isolati conosciuti del virus. La caratterizzazione del virus così individuato e quantificato viene condotta mediante reazioni di PCR con primer dedotti da varie porzioni del genoma di TTV, specifiche per le singole specie del virus, e successivo sequenziamento dell'amplificato ottenuto. TTV è globalmente diffuso nel mondo e può essere rilevato, sotto forma di infezione cronica, nel sangue di circa 2/3 della popolazione generale, indipendentemente da origine etnica, età, condizioni socio-economiche e altre variabili. Una così elevata prevalenza dell'infezione presuppone che TTV sia altamente contagioso e che la sua diffusione avvenga attraverso molteplici modalità di trasmissione. Fra queste, quelle sicuramente dimostrate includono la via parenterale, la via oro-fecale e la via materno-fetale. Tuttavia, la presenza del virus in saliva, secrezioni nasofaringee, liquido spermatico, fluido vaginale e latte materno, indica come possibili anche altre vie di trasmissione. Pochi studi hanno investigato la prevalenza delle differenti specie di TTV. Non è noto se esse siano trasmesse con differente efficienza ma appare certo che alcune sono più diffuse di altre e che la loro distribuzione dipende, almeno in parte, dall'area geografica o dal tipo di popolazione esaminata.

Razionale. Per predire esito ed eventi avversi di un trapianto di organo solido sono indispensabili parametri di laboratorio che consentano di "personalizzare" al meglio la terapia per minimizzare il rischio di complicanze nel follow-up (infezioni opportunistiche e tumori secondari da un lato, e rigetto d'organo dall'altro). Ad oggi, nessun parametro biologico è utilizzabile come marcatore universale per predire l'andamento del follow-up post-trapianto e/o per definire lo status di funzionalità del sistema immune. I parametri fino ad oggi utilizzati (biochimici, immunologici, clinici, ecc...) danno informazioni parziali, sono laboriosi da ottenere, e devono essere necessariamente combinati fra di loro risultando di fatto in complessi algoritmi e/o score di complicata gestione nella pratica clinica. La scoperta che la replica di TTV è strettamente correlata all'immunità immuno-mediata dell'ospite infettato, ne suggerisce l'uso nei pazienti trapiantati come

sensibile, oggettivo ed affidabile indicatore della funzionalità del sistema immunitario. Studi recenti da parte di numerosi gruppi di ricerca europei ed extraeuropei dimostrano l'efficacia del dosaggio di TTV nel predire la comparsa di complicanze a medio e lungo termine (infezioni e/o rigetto) in diverse tipologie di trapianto di organo solido, e nel modulare la terapia immunosoppressiva di induzione e di mantenimento in relazione all'intensità replicativa del virus. Inoltre, la valutazione della viremia di TTV e la caratterizzazione genetica del virus eseguita nel donatore, qualora disponibile, costituisce elemento utile per un più idoneo monitoraggio della viremia nel relativo ricevente.

Scopo. Scopo finale del progetto è quello di proporre l'utilizzo di un marcatore virale in campo trapiantologico al fine di sviluppare approcci diagnostici innovativi per la valutazione immunovirologica del donatore di organo solido e per la stratificazione prognostica ed il follow-up precoce e tardivo del ricevente. Gli obiettivi sono quelli di:

1. valutare la relazione esistente fra la cinetica dei livelli della viremia di TTV nel pre-trapianto e nelle prime due settimane post-trapianto e la concentrazione del farmaco(i) immunosoppressore(i) con misura dei due parametri sullo stesso prelievo di sangue;
2. identificare livelli di viremia di TTV che consentano la più potente e precisa predizione sia del rigetto del trapianto che delle complicanze infettive nel follow-up clinico del paziente trapiantato;
3. sviluppare un algoritmo e/o uno score della viremia di TTV che possa essere applicato dal clinico nel monitoraggio della terapia immunosoppressiva e delle complicanze post-trapianto.

Parte sperimentale. Lo studio si propone di investigare l'andamento dell'infezione da TTV in almeno 50 pazienti (max 100 pazienti) trapiantati di organo solido. La viremia di TTV sarà quantificata sullo stesso campione di sangue prelevato per la misura della concentrazione di farmaci immunosoppressivi. I prelievi saranno ottenuti prima del trapianto e ad intervalli regolari (almeno ogni 3 giorni) nei primi 15 giorni post-trapianto ed almeno 1 volta al mese nel successivo periodo di follow-up. I campioni di sangue saranno centrifugati e il plasma ottenuto, aliquotato e conservato a -80° C fino al momento dell'utilizzo. Quando possibile, un prelievo di sangue sarà ottenuto anche dal soggetto donatore. La presenza e i livelli di TTV saranno determinati utilizzando una metodica di TaqMan real-time PCR disegnata nei nostri laboratori sulla UTR del genoma virale che risulta altamente conservata fra tutti i TTV ad oggi conosciuti. Tale reazione, che può dunque definirsi

“universale” cioè in grado di amplificare con uguale efficienza tutte le diverse specie di TTV, ha un limite inferiore di sensibilità di circa 10 copie di DNA per ml di plasma. La caratterizzazione delle singole specie di TTV sarà ottenuta con l’uso di specifiche reazioni di PCR progettate su regioni diverse del genoma virale. Per tutte le amplificazioni sarà utilizzato lo stesso protocollo con uniche differenze nei primers e nella temperatura di annealing. Gli amplificati ottenuti saranno sequenziati e le sequenze ottenute confrontate con quelle di TTV presenti in banca dati.

Bibliografia essenziale

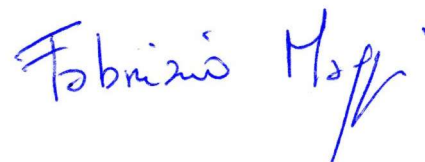
1. Nishizawa et al. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 92-97 (1997).
2. De Vlamincq et al. Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell* 155, 1178-1187 (2013).
3. Maggi, et al. Immunobiology of the torque teno viruses and other anelloviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 331, 65-90 (2009).
4. Görzer et al. Plasma DNA levels of torque teno virus and immunosuppression after lung transplantation. *J. Heart. Lung Transplant.* 33, 320-323 (2014).
5. Focosi et al. Torque teno virus viremia correlates with intensity of maintenance immunosuppression in adult orthotopic liver transplant. *J. Infect. Dis.* 210, 667-668 (2014).
6. Görzer et al. Association between plasma Torque teno virus level and chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant.* 36, 366-368 (2017).
7. Béland et al. Torque teno virus load as a biomarker of immunosuppression? New hopes and insights. *J. Infect. Dis.* 210, 668-670 (2014).
8. Hofer, U. Microbiome: Anelloviridae go viral. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 4-5 (2013).
9. Simonetta et al. Torque teno virus load and acute rejection after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 101, 219-221 (2017).
10. Fernandez-Ruiz et al. Monitoring of alphatorquevirus DNA levels for the prediction of immunosuppression-related complications after kidney transplantation. *Am. J. Transpl.* (2018).
11. Kotton. Torque Teno Virus: Predictor of Infection After Solid Organ Transplant? *J. Infect. Dis.* 218, 1185-1187 (2018).

Richiesta Finanziamento:

L'importo richiesto è di 30.000 euro comprensivi dei reagenti e/o materiale d'uso (materiale per biologia molecolare, kit di estrazione acidi nucleici, plasticheria, ecc...) per la sperimentazione e per l'attivazione di una borsa di studio.

Pisa, 21 novembre 2018

Prof. Fabrizio Maggi

A handwritten signature in blue ink, reading "Fabrizio Maggi".