



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI  
DI GENOVA

Dipartimento di Scienze della salute

Dottorato XXXII CICLO

Metodologie Innovative Applicate a Malattie Trasmissibili e Cronico-  
degenerative: Epidemiologia, Statistica, Prevenzione, Management e  
Nursing

Epidemiologia e profilassi di malattie prevenibili con vaccinazione

## **"Valutazione della profilassi con Letermovir nei pazienti CMV positivi sottoposti a trapianto di midollo allogenico"**

Candidata: Dott.ssa Giulia Guarona  
Relatore: Prof. Giancarlo Icardi

## **1. HERPESVIRUS**

1.1 Caratteristiche generali

1.2 Genoma

1.3 Morfologia

1.4 Replicazione

## **2. CITOMEGALOVIRUS (CMV)**

2.1 Morfologia

2.2 Genoma

2.3 Epidemiologia ed eziologia

2.4 Patogenesi

2.5 Modalità d'infezione

2.6 Manifestazioni cliniche nel paziente immunocompromesso

## **3. LE CELLULE STAMINALI**

3.1 Le fonti di cellule staminali

3.2 Il trapianto di cellule staminali emopoietiche

3.3 Il regime di condizionamento

3.4 Attecchimento

3.5 Complicanze post trapianto

3.6 Fattori di rischio

## **4. TERAPIE ANTIVIRALI E RESISTENZE**

4.1 Nuova profilassi da CMV nei pazienti sottoposti a trapianto di midollo allogenico (HSMC)

## **5. OBIETTIVO DELLO STUDIO**

## **6. POPOLAZIONE DELLO STUDIO**

## **7. PREPARAZIONE CAMPIONI**

## **8. TECNICHE DIAGNOSTICHE**

## **9. RISULTATI**

## **10. CONCLUSIONI**

## **11. BIBLIOGRAFIA**

## 1. HERPESVIRIDAE

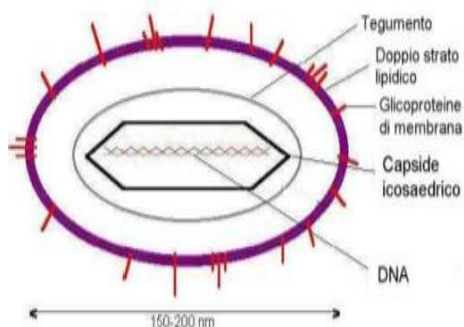


Fig.1 herpesvirus

### 1.1 Caratteristiche Generali

La famiglia degli Herpesviridae include i più importanti patogeni umani responsabili di malattie con quadri clinici diversi. Il nome Herpes deriva dal greco "*herpein*" che significa diffondersi.(1) Alcuni herpesvirus presentano un ampio spettro d'ospite, mentre altri hanno un tropismo molto selettivo. La peculiare caratteristica di questa famiglia é la loro capacità di causare infezioni latenti per tutta la vita con periodiche riattivazioni, ciò rappresenta un grave problema sanitario in pazienti immunocompromessi.(2) Inoltre la sintomatologia può essere molto diversa rispetto a quella delle infezioni primarie. Gli Herpesvirus o *Herpesviridae* sono caratterizzati dalla presenza di un doppio strato fosfolipidico detto *envelope*, dal *tegumento* e da un *capside* a simmetria cubica costituito da capsomeri.(1) Il genoma è costituito da DNA a doppio filamento, uno a polarità positiva e uno a polarità negativa. I singoli

filamenti possiedono delle sequenze palindromiche al 5' e al 3' terminale; tali sequenze sono riscontrabili all'interno del genoma e permettono di dividere l'intero filamento in più porzioni. La replicazione e i processi di sintesi proteica avvengono per la totalità all'interno del nucleo della cellula ospite. La trascrizione avviene grazie alla presenza della RNA-polimerasi cellulare. Una volta trascritto, l'mRNA virale viene tradotto in base a delle priorità, a seconda delle quali si distinguono geni precoci e geni tardivi. L'incapsidamento avviene all'interno del nucleo. Gli *Herpesvirus* vengono suddivisi in tre sottofamiglie in base al loro sito di latenza:(3)

- Alphaherpesvirinae: sono caratterizzati da un ampio spettro e sono altamente litici in coltura. Il ciclo replicativo è breve e i siti di latenza sono le cellule nervose. (HSV1, HSV2, VZV)
- Betaherpesvirinae: hanno uno spettro più ristretto, crescono più lentamente in coltura e causano un aumento delle cellule ospiti. Il sito di latenza è costituito dai leucociti. Il Citomegalovirus appartiene a questa sottofamiglia insieme all' Herpesvirus umano 6.
- Gammaherpesvirinae: infettano i linfoblasti, il Virus di Epstein-Barr (EBV) appartiene a questa sottofamiglia insieme all' Herpesvirus umano 8 (HHV8); il sito di latenza dell'EBV è rappresentato dai leucociti, mentre quello dell' HHV8 non è ancora noto.

Di particolare interesse sono gli Herpesvirus umani, cioè quelli che attaccano l'uomo, o Human Herpes Virus, indicati con la sigla HHV. Attualmente, sono noti otto Herpesvirus umani:

- Alphaherpesvirinae:

HHV-1 Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1)

HHV-2 Herpes Simplex Virus 2 (HSV-2)

HHV-3 Varicella-Zoster Virus (VZV)

- Betaherpesvirinae:

HHV-5 Citomegalovirus (CMV)

HHV-6 Herpesvirus umano 6

HHV-7 Herpesvirus umano 7

- Gammaherpesvirinae:

HHV-4 Epstein-Barr Virus (EBV)

HHV-8 Herpesvirus umano 8 (KSHV Virus del Sarcoma di Kaposi)

SOTTO FAMIGLIA	PROPRIETA' BIOLOGICHE				
	CICLO DI CRESCITA	CITOPATOLOGIA	LATENZA	NOME UFFICIALE	NOME COMUNE
ALPHA HERPES	BREVE	CITOLITICO	NEURONI	HHV1 HHV2 HHV3	HSV1 HSV2 VZV
BETA HERPES	LENTO	CITOMEGALICO  LINFOPROLIFERATIVO	GHIANDOLE RENI LINFONODI  TESSUTO LINFOIDE	HHV5  HHV6 HHV7	<b>CMV</b>  HHV6 HHV7
GAMMA HERPES	VARIABILE	LINFOPROLIFERATIVO	TESSUTO LINFOIDE	HHV4  HHV8	EBV  HHV8

Fig.2 classificazione Herpesvirus umani

## 1.2 Genoma

I genomi degli Herpes virus condividono alcune importanti proprietà:

- Contengono tutti una lunga "unique region" che di solito misura oltre 100 kb che codifica in media un centinaio di geni;
- I virus contengono un certo numero di elementi ripetuti sia interni che terminali, che sono variabili nella dimensione e nel numero.

Una caratteristica sorprendente è il riarrangiamento delle sequenze: il genoma presenta sequenze terminali ed interne ripetute con possibile formazione di forme genomiche isomeriche. Le linee orizzontali rappresentano sequenze uniche (U). Le sequenze terminali sono costituite da due elementi: ab e ca, che possono essere inserite con un orientamento inverso separando le sequenze uniche in 2 domini: lungo (UL) e corto (US).

### **1.3 Morfologia**

Sono stati descritti in varie specie animali più di 100 tipi diversi di Herpesvirus i quali sono univocamente identificati dall'architettura del virione.

Ci sono quattro principali componenti strutturali:

1. Un core elettrondenso che contiene il dsDNA virale;
2. Un capsidico icosaedrico proteico che circonda il core del virus, costituito da 162 capsomeri;
3. Uno strato amorfo che circonda il capsidico detto tegumento;
4. Un rivestimento a doppio strato lipidico (pericapsidico), contenente delle spine protudenti, costituite da glicoproteine virali.

### **1.4 Replicazione**

Benché le particelle virali di Herpesvirus contengano un DNA lineare, questo viene rapidamente circolarizzato all'interno della cellula infettata. Questa forma circolare del genoma è necessaria per la replicazione.

La replicazione del DNA dell'Herpesvirus avviene in due fasi distinte:

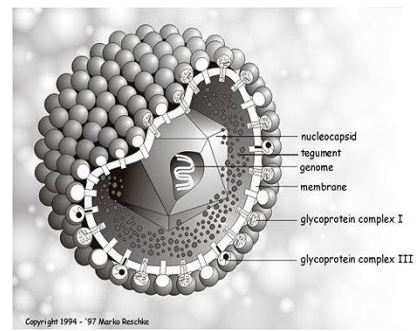
- la fase iniziale avviene a partire da origini di replicazione specifiche per la fase litica;



- la fase tardiva comprende la replicazione del DNA tardiva che avviene con un meccanismo di ricombinazione-dipendente in cui la sintesi del DNA avviene in tutto il genoma virale.

In tutti gli Herpesvirus, con l'apparente eccezione del CMV, l'origine serve da sito di legame specifico per una proteina essenziale, codificata dal virus, che si pensa apra la doppia elica del DNA a livello del sito specifico e diriga il meccanismo di replicazione del DNA virale verso questo sito. Poco dopo l'inizio della replicazione del DNA, avviene uno switch nella modalità della replicazione. Questo è probabilmente il risultato della "strand invasion", un processo attraverso cui un filamento di un tratto di DNA si appaia con una sequenza complementare di un secondo tratto di DNA. Questo processo è mediato dalla ricombinazione omologa. Il risultato è la formazione di una molecola di DNA ramificata; numerosi di questi eventi portano alla formazione di una struttura molto complessa non lineare che contiene ramificazioni multiple.

## 2. CITOMEGALOVIRUS (CMV)



Il nome citomegalovirus (CMV o HHV-5) è stato coniato da Weller, in sostituzione delle vecchie denominazioni di "virus delle ghiandole salivari" o di "virus della malattia da inclusioni citomegaliche". (4)

Il CMV dà più spesso infezioni inapparenti e di rado causa malattia, con ampia variabilità del quadro clinico. Sono riconosciute infezioni primarie (in soggetti suscettibili) e infezioni ricorrenti, legate alla riattivazione di un'infezione latente o a una reinfezione esogena. La sede della latenza virale è probabilmente rappresentata dai monociti, dai linfociti e dai neutrofili circolanti. Le infezioni primarie danno malattie più gravi, anche nell'embrione e nel feto.

Le cause della riattivazione possono essere esogene per esempio per esposizione prolungata ai raggi UV o endogene in caso di debilitazione del sistema immunitario.

Le infezioni da CMV tuttavia si rivelano particolarmente pericolose, se non letali, quando il soggetto infetto presenta un'incompetenza immunologica, sia naturale che indotta. Durante la gravidanza la donna che non ha mai contratto infezione da CMV deve essere monitorata per escludere la presenza di tale virus, in quanto estremamente pericoloso per il feto. I segni dell'infezione congenita da CMV variano dalla paralisi cerebrale al ritardo mentale e alla sordità nel 90% dei neonati positivi all'infezione. Nel caso invece di soggetti immunocompromessi per patologie come per esempio l' AIDS o per terapie trapiantologiche che

richiedono l'immunosoppressione, il CMV si rivela essere uno dei maggiori agenti patogeni opportunisti, con compromissione di organi e funzioni vitali. Le cellule infettate possono rilasciare tre diversi tipi di particelle: i virioni infettivi, le particelle non infettive (NIEP) e i corpi densi (DB).(5)

## 2.1 Morfologia

E' il virus più grande della famiglia Herpesviridae, con un DNA di 250 Kbp.(5)

Il CMV è costituito da :

- core centrale del virus: una matrice proteica con diametro di 64 nm associata al DNA lineare a doppia catena del genoma virale;
- capside icosaedrico: formato da 162 subunità proteiche tubulari dette capsomeri con le quali circonda il core. Il suo diametro è di circa 100nm;
- peplos: rivestimento esterno lipoproteico che forma l'involucro del virus, costituito da un doppio strato lipidico di origine cellulare e da proteine di membrana specifiche del virus. Tra le proteine virali dell'involucro sono importanti alcune proteine glicosilate, denominate gB e gH, per il ruolo di interazione tra il virus e la cellula target e il ruolo fondamentale nell'assorbimento e nella penetrazione;
- tegumento: situato tra involucro e capside, esso contiene una serie di proteine che hanno importanti funzioni regolatorie del ciclo di replicazione. Tra le proteine che lo costituiscono troviamo la Fosfoproteina basica (pp150) e le "Upper and Lower Matrix Proteins" (pp71 e pp65)(6). Nel CMV, circa 30-45 proteine strutturali sono coinvolte nella formazione virale, ma il numero esatto non è noto.

## 2.2 Genoma

Il genoma del CMV è il più complesso di tutti i virus patogeni che si conoscono fino ad oggi (5); è rappresentato da un DNA bicatenario lineare che contiene più di 200 sequenze in grado di essere trascritte. Le proteine sintetizzate conosciute sono circa 100, di cui una trentina sono proteine strutturali, mentre le restanti vengono utilizzate per la replicazione del DNA, trascrizione e traduzione dei vari geni e per modifiche post-traduzionali. Il genoma è costituito da due sequenze uniche UL e US all'estremità delle quali sono localizzate sequenze ripetute e invertite.

La sequenza nucleotidica del ceppo di laboratorio ADI69 è stata determinata e comprende 229.354 coppie di basi. Dati più recenti affermano che gli isolati clinici hanno sequenze di DNA aggiuntive nell'ambito di 15.000 coppie di basi, quindi la lunghezza totale del genoma del CMV può arrivare a quasi 250.000 coppie di basi. Con l'analisi del DNA virale mediante enzimi di restrizione non è possibile trovare due isolati che mostrano pattern di restrizione identico. Tra i fattori che determinano le diversità genomiche, in tutti gli herpesvirus, rientrano l'acquisizione sia di geni del DNA della cellula ospite, sia di geni che provengono da altri virus che coinfettano la stessa cellula (7). Tuttavia il significato delle variazioni del ceppo durante l'infezione non è chiaro, alcuni studi suggeriscono che ci potrebbe essere una relazione tra isolato virale e andamento dell'infezione.

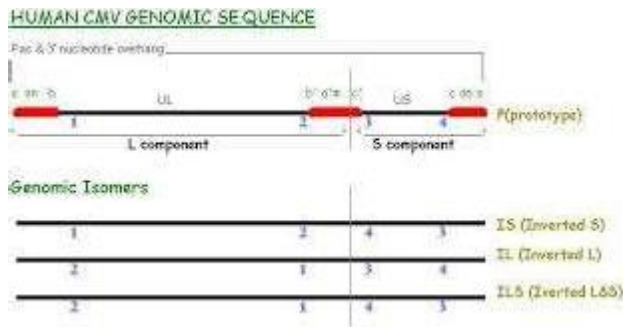


Fig.3 sequenza genomica

## 2.3 Etiologia Ed Epidemiologia

I virus citomegalici comprendono un gruppo di agenti della famiglia degli Herpesvirus, conosciuti per la loro distribuzione ubiquitaria, sia nell'uomo, sia in molti mammiferi. Tutti i ceppi di CMV sono geneticamente omologhi, ma nessuno è identico, a meno che non sia stato isolato da casi epidemiologicamente collegati fra loro. La malattia è strettamente specie-specifica: l'uomo è l'unico serbatoio, questo ne permette la coltivazione "in vitro" solo su fibroblasti umani. Al contrario, "in vivo", ha uno spettro più ampio, replicandosi anche in cellule epiteliali e linfociti. Non si conoscono vettori nel ciclo naturale di trasmissione. I CMV, caratteristici di altre specie, sono ad esse limitati e non diffondono all'uomo. L'escrezione del virus può continuare per anni dopo un'infezione congenita, perinatale o post-natale precoce, attraverso le urine (per 6 o più anni) e la saliva (per 2-4 anni). Anche gli adulti dopo un'infezione primaria eliminano virus a lungo. Un'escrezione intermittente di virus può avvenire dall'altra parte in una buona proporzione di adulti CMV-positivi, per cui esiste sempre nella popolazione un grande serbatoio di virus.

Studi epidemiologici hanno evidenziato che la prevalenza di anticorpi per il CMV aumenta con l'età, a seconda della situazione geografica, etnica e socioeconomica delle popolazioni studiate. La prevalenza dell'infezione da CMV è risultata maggiore nei paesi in via di sviluppo e nelle classi socio- economiche più basse dei paesi sviluppati(8). Esso è presente anche nel latte di donne CMV positive, tanto è vero che può essere trasmesso tramite l'allattamento al seno durante il primo anno di vita. Nei paesi in via di sviluppo l'80% dei bambini già all'età di tre anni possiede anticorpi anti-CMV (9). Il livello d'immunità nelle donne in età feconda varia anch'esso fortemente nelle diverse popolazioni: in Europa la variabilità va dal 50% all'85%. Nei lattanti non infetti gli anticorpi IgG di origine materna hanno un tempo di dimezzamento di circa 1 mese e scompaiono entro 4-9 mesi. Al contrario, nei lattanti infetti i livelli di IgG rimangono elevati e spesso superano i livelli presenti nella madre; nei neonati infetti sono anche presenti alti livelli di IgM specifiche e il Citomegalovirus può essere rilevato anche nelle urine in quantità elevata.

## **2.4 Patogenesi**

Gli Herpesvirus sono ubiquitari e l'infezione primaria generalmente si manifesta in maniera subclinica nella prima infanzia; il virus rimane latente per tutta la vita potendo causare un'infezione secondaria che è solitamente localizzata e più

frequente nei soggetti anziani o immunocompromessi. L'CMV può riattivarsi in

qualsiasi momento e sono possibili anche reinfezioni anche con altri ceppi (10).

L'infezione da CMV , nella maggior parte dei casi, è asintomatica poiché è dotato di scarsa patogenicità.

Gli aspetti importanti dell'infezione da CMV negli umani sono:

- la capacità del virus di distruggere le cellule dell'ospite;
- di infettare cellule e tessuti diversi;
- di evadere e interferire con i meccanismi di difesa dell'ospite;
- di persistere indefinitivamente nelle cellule dell'ospite, come tutti gli altri herpesvirus.

Il CMV influenza negativamente in vario modo tutti sistemi immunologici:

- inibisce le risposte dei linfociti T-citotossici dell'ospite, interferendo con l'elaborazione e la presentazione degli antigeni virali da parte delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) classe I;
- interferisce con le risposte delle cellule T-helper, per degradazione delle molecole MHC della classe II;
- inibisce l'attività "killing" delle cellule "natural killer";
- codifica inoltre per proteine che hanno la capacità di impedire le difese dell'ospite contro i virus, attraverso altri meccanismi come l'interferenza con l'apoptosi e la lisi mediata dal complemento o sequestrando le citochine;

- codifica per chemochine che hanno la capacità di attirare neutrofili e monociti, in modo tale da facilitare la disseminazione del virus.

Proprio per queste molteplici capacità risulta che l'infezione da CMV è il frutto di un delicato equilibrio, che in soggetti immunocompetenti porta alla presenza del virus e all'assenza di malattia. Quando questo bilancio è disturbato da una inadeguata risposta immune dell'ospite e/o da un ceppo virale di aumentata virulenza, si ha la moltiplicazione virale e il virus si diffonde fino a causare la malattia.

La cellula ospite subisce delle modificazioni a causa delle interazioni che avvengono tra il CMV e la fisiologia cellulare (11.12.13):

- Effetto citopatico (CPE) determinato sia dall'aumentata permeabilità della membrana cellulare che dall'aumentato metabolismo;
- Ingrandimento e arrotondamento della cellula "Cell Rounding", fenomeno che determina la citomegalia che dà il nome al virus stesso.

Le famose cellule citomegaliche, descritte in molti organi (parotidi) sono cellule epiteliali infettate, grandi da 2 a 4 volte le cellule normali. Esse presentano un corpo incluso intranucleare che occupa la maggior parte del nucleo della cellula: esso è, in modo caratteristico, separato dalla membrana nucleare da un alone chiaro, da cui deriva il nome di cellule a occhio di civetta.

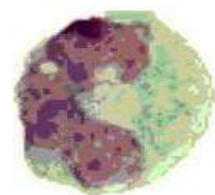


Fig.4 cellula citomegalica



## 2.5 Modalità di infezione

La trasmissione può avvenire verticalmente dalla madre al feto o oppure da individuo ad individuo (trasmissione orizzontale), attraverso contatto diretto o indiretto. I veicoli di trasmissione del virus sono il sangue, l'urina, le secrezioni oro-faringee, le secrezioni cervicali o vaginali, lo sperma, il latte materno e le lacrime.(1) La diffusione dell'infezione richiede contatti stretti e prolungati con pazienti infetti. Gli oggetti, inoltre, possono avere anche loro un ruolo nella trasmissione del CMV: il virus è stato ritrovato sulle superfici di plastica e in generale sui giocattoli, anche alcune ore dopo la sua emissione(14). Quindi luoghi ad alto rischio di trasmissione dell'infezione sono gli asili nidi e le scuole materne. I contatti sessuali e i trapianti sono altre due vie di trasmissione.

L'ingresso delle particelle virali nella cellula ospite può avvenire sia tramite endocitosi, sia attraverso la fusione con la membrana cellulare dell'involucro pericapsidico (5).

L'interazione iniziale del CMV con la cellula target avviene attraverso il contatto delle proteine dell'involucro con le strutture di eparitin-solfato sulla superficie delle cellule. Sul lato virale sembrano essere coinvolti la glicoproteina B(gB) e il complesso glicoproteico gCII, mentre sul versante cellulare l'interazione sembra mediata dalla catena pesante degli antigeni HLA di classe I presenti sulla superficie delle cellule. Segue l'assorbimento a livello della superficie cellulare,

mediato da recettori non ancora identificati, attraverso cui l'involucro virale si fonde con la membrana cellulare. Il capsido, insieme al tegumento, entra nel citoplasma, dove si accumula nei microtubuli della cellula e viene trasportato ai pori nucleari. Nel nucleo il genoma virale lineare si può diffondere e viene trasformato in episoma. A questo punto inizia la trascrizione virale ad opera dell'RNA polimerasi.

Il ciclo cellulare si articola in 3 fasi:(15)

- a. Fase precocissima: durante questo periodo vengono trascritti i geni chiamati "Immediate Early" (IE). Le proteine da questi sintetizzate presentano una elevata affinità per il DNA e portano alla comparsa di antigeni nucleari detti "Immediate Early Antigens" (IEA) responsabili della trascrizione dell'RNA. La principale IE è la p72, essa è rilevabile nelle cellule infettate entro un'ora;
- b. Fase precoce: sono coinvolti i geni che codificano proteine definite precoci o Early Antigens (EA). Vengono prodotti circa 20 differenti antigeni precoci necessari alla replicazione del DNA. I più conosciuti sono la glicoproteina di 48Kd (GP48), la proteina pp65, localizzata nei corpi densi, e soprattutto la DNA polimerasi virale che dà inizio alla replicazione;

- c. Fase tardiva: inizia dopo la replicazione del DNA virale ed è estesa a tutto il genoma virale neosintetizzato (15). In questa fase vengono trascritti i geni che codificano per i cosiddetti "Late Antigens" che comprendono proteine strutturali che andranno a costituire il capsido del virus e glicoproteine (GB e GH) in grado di esporsi sulla superficie cellulare e di provocare una risposta anticorpale capace di neutralizzare il virus. Le IgM anti-CMV sono dirette contro gli antigeni delle proteine p150 e pp65, mentre le IgG verso la p28.

## **2.6 L'infezione da Citomegalovirus nell'ospite compromesso**

La maggior parte delle infezioni da CMV nei soggetti immunocompromessi è dovuta a riattivazione del CMV, che ha infettato l'ospite in un passato lontano, spesso in modo inapparente. Altre volte, più di rado, il soggetto immunocompromesso presenta un'infezione primaria da CMV, e solitamente è accompagnata dai sintomi della malattia. Le più importanti sorgenti di infezione da CMV in questi soggetti sono da un lato le trasfusioni di sangue intero o di derivati e dall'altra i trapianti da donatore sieropositivo per il CMV; sono stati descritti in letteratura molti casi di infezione primaria da CMV in soggetti che avevano ricevuto un trapianto di rene da un soggetto sieropositivo. L'incidenza delle infezioni da CMV dipende dal tipo di trapianto e dallo stato sierologico sia del donatore sia del ricevente (D+/ R+ ; D+/ R-; D-/ R+; D-/ R-)(16). Nei soggetti trapiantati onco-ematologici i pazienti ad alto rischio sono i riceventi CMV-positivi da donatore CMV-negativi; mentre per i trapiantati di organo solido la

popolazione ad alto rischio sono i riceventi CMV-negativi da donatore CMV-positivo. Le manifestazioni cliniche dell'infezione da CMV, sia essa primaria o da riattivazione, correlano in modo stretto con il grado di alterazione immunologica dei soggetti trapiantati o con AIDS. La manifestazione clinica più frequente nell'adulto è la mononucleosi infettiva, una malattia caratterizzata da febbre prolungata, mialgie, malessere, alterazioni della funzionalità epatica e linfocitosi, mentre fra i trapiantati la più grave malattia da CMV si osserva nel trapianto di midollo osseo allogenico e in pazienti trattati con immunosoppressione aggressiva. Fra i pazienti con AIDS, la maggior parte delle malattie da CMV si manifesta quando le cellule CD4 positive sono meno di 100/ mcL.

L'infezione da Citomegalovirus umano (CMV) è la più importante complicazione virale e la principale causa di morbilità e mortalità nei pazienti trapiantati. Si manifesta soprattutto tra la 3° e la 6° settimana dopo il trapianto e raggiunge il picco al 40° giorno. Un'appropriate diagnosi in questi pazienti risulta essenziale per distinguere i sintomi del rigetto dall'infezione da CMV ed eventualmente nella prevenzione di quest'ultima.

Nei pazienti trapiantati l'infezione primaria è caratterizzata da febbre e leucopenia, spesso il quadro clinico presenta anche esantema, artralgia e aumento delle aminotransferasi sieriche. Tra le complicazioni più gravi nei soggetti trapiantati si ricordano l'interessamento della funzione dell'organo trapiantato, la polmonite interstiziale, le ulcere gastro-intestinali, l'epatite e le infezioni fungine anch'esse opportunistiche, mentre, tra i soggetti con AIDS, le complicazioni più frequenti sono legate alla retinite, all'esofagite e alla colite. Altre complicazioni meno frequenti sono l'encefalite e la neuropatia periferica.

L'infezione da CMV, soprattutto, nei pazienti ad alto rischio richiede una diagnosi precoce che non è possibile solo sulla base della valutazione del quadro clinico, a causa delle molteplici manifestazioni cliniche.

### 3. CELLULE STAMINALI

Con il termine cellule staminali si intende una popolazione di cellule indifferenziate aventi la capacità di dividersi per un periodo indefinito, in grado di autorigenerarsi e di dare origine a una progenie altamente specializzata (17).

Le staminali possono essere:

- Totipotenti: danno origine a tutti i tessuti;
- Pluripotenti e multipotenti: possono generare più di un tessuto;
- Unipotenti: danno vita ad un solo tipo di tessuto.

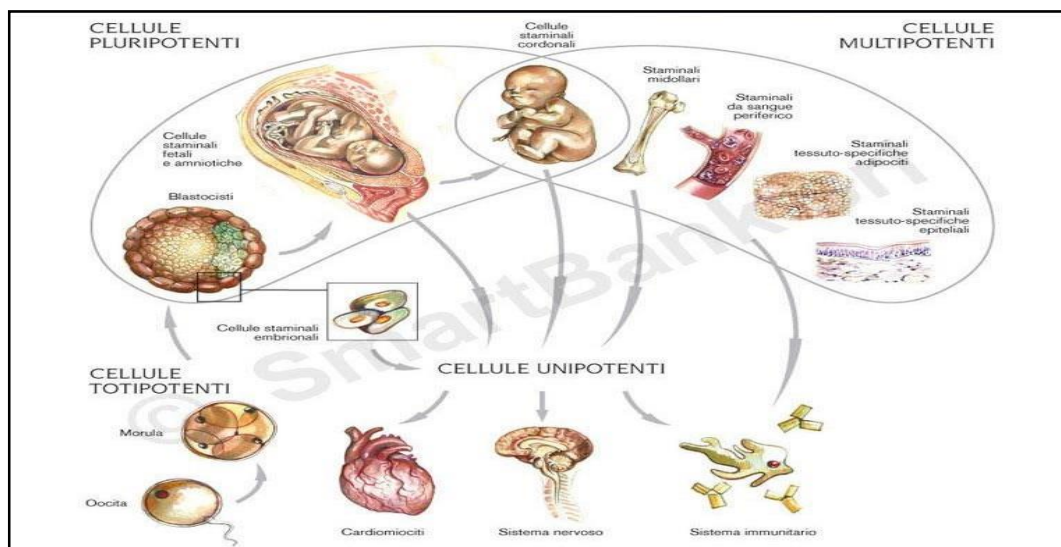


Fig.5: Schema dei diversi tipi di cellule staminali

Le cellule staminali emopoietiche (CSE) sono cellule staminali che danno origine a tutte le cellule del sangue. Nell'uomo si possono trovare nel cordone ombelicale, come risultato delle proprietà migratorie delle cellule staminali durante lo sviluppo fetale e nel midollo osseo, che è l'unico organo che le ospita in età adulta (18). Queste cellule sono in grado di rigenerare l'ambiente midollare in tutti quei casi in cui esso sia stato danneggiato in seguito a patologie (ad esempio aplasie midollari), esposizione accidentali a radiazioni ionizzanti o a trattamenti chemio-radioterapici per la terapia di patologie tumorali. Il tessuto midollare viene generalmente aspirato dalla cresta iliaca posteriore in anestesia locale o generale. La quantità di cellule staminali necessarie per il ripopolamento midollare deve essere proporzionato al peso del ricevente.

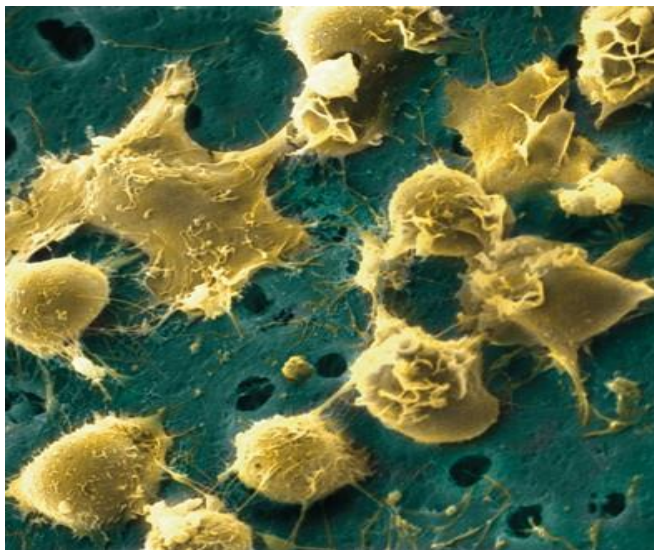


Fig.6 cellule staminali

### **3.1 Fonti di cellule staminali**

Le cellule staminali possono essere di origine midollare, dopo espianto del donatore, da sangue periferico dopo mobilizzazione con fattore di crescita o da cordone ombelicale criopreservato.

Le cellule staminali da cordone ombelicale sono una valida alternativa in assenza di donatori viventi, ma il loro utilizzo è strettamente vincolato, ad esempio il peso del ricevente è uno dei principali fattori limitanti (19).

### **3.2 Il trapianto di cellule staminali emopoietiche**

Il trapianto è un procedura terapeutica che prevede la sostituzione di cellule, tessuti o organi danneggiati o malfunzionanti, con altri sani provenienti da un soggetto diverso (donatore). Il trapianto di midollo osseo è un trapianto di cellule staminali emopoietiche e consiste nell'asportare e conservare in modo adeguato le CSE per poi reinfonderle al paziente nel momento opportuno. Il trapianto di cellule staminali emopoietiche (CSE) si è affermato come una delle strategie terapeutiche potenzialmente curative in molte emopatie (leucemie acute e croniche, linfomi, mielomi, aplasia midollare, Talassemia Major...) per le quali le terapie convenzionali non offrono che scarse o nulle possibilità di guarigione. Tramite il trapianto di CSE si vuole sostituire il compartimento alterato di cellule staminali del paziente con un patrimonio di cellule sane capace di ricostituire il

sistema emopoietico e immunitario del ricevente. Il raggiungimento di questo obiettivo dipende da tre fattori principali:

- a. Dalla scomparsa totale del compartimento di cellule staminali del paziente attraverso una chemio-radioterapia pre-trapianto, detta condizionamento, il più possibile eradicante la malattia e fondamentale nel creare lo spazio necessario alle cellule staminali che verranno infuse per poter “attecchire” (20);
- b. Dal superamento, ai fini dell’attecchimento, della barriera immunologica rappresentata dalle cellule immunocompetenti del ricevente che sono responsabili del rigetto;
- c. Dal superamento della barriera immunologica rappresentata dalle cellule immunocompetenti attive del donatore presenti nella sospensione di cellule staminali infuse, che causano una risposta esagerata nel paziente immunocompromesso aggredendo il suo sistema immunitario (GVHD) .



Esistono vari tipi di trapianto (20):

- Autologo: trapianto di CSE dello stesso paziente dopo opportuno trattamento;
- Singenico: trapianto di CSE da gemello monocoriale;
- Allogenico: trapianto di CSE da un donatore sano, familiare o non familiare con caratteristiche genetiche simili (compatibilità tissutale) a quelle del ricevente.

Il trapianto di midollo osseo allogenico (ALLO-TMO) rappresenta la principale procedura terapeutica a intento curativo per la maggior parte delle neoplasie ematologiche maligne.

I trapianti allogenici possono derivare da:

- Familiare HLA-identico: fratello che ha ereditato dai genitori gli stessi cromosomi su cui sono codificati i geni di istocompatibilità. La probabilità che due fratelli siano HLA-identici fra loro è del 25%;
- Non familiare HLA-identico detto anche Matched Unrelated Donor (MUD): individuo sano iscritto nel registro dei donatori di midollo (IBMDR-Italian Bone Marrow Donor Registry). Oltre ai donatori volontari adulti è possibile ottenere CSE da sangue cordonale raccolto crioconservato;

- Familiare HLA-aploidentico: parente che ha in comune almeno uno dei due cromosomi su cui sono codificati i geni di istocompatibilità. Sono sempre aploidentici i genitori e i figli; la probabilità di un fratello aploidentico è del 50%. Si possono trovare donatori aploidentici anche in parenti più lontani: per questo la percentuale di pazienti con almeno un donatore familiare aploidentico è superiore all'80%.

Negli ultimi anni si è registrata una notevole espansione di questa procedura grazie a una riduzione della mortalità legata al trapianto, al miglioramento della terapia di supporto, delle tecniche di tipizzazione HLA, delle terapie delle complicanze infettive post-trapianto e a diagnosi sempre più tempestive da parte dei clinici.

### **3.3 Regimi di condizionamento**

La procedura trapiantologica è in continua espansione e alla fine degli anni '90 è stato introdotto il regime di condizionamento ad intensità ridotta (20). Il condizionamento è un insieme di procedure che precedono il trapianto e consistono nella somministrazione di alte dosi di chemioterapia o radioterapia. Infatti esistono tre tipi di regimi di condizionamento in preparazione al trapianto: mieloablativo (MAC), ad intensità ridotta (RIC) e mieloablativi alternativi (NMA) (21). Il condizionamento mieloablativo è rappresentato principalmente dalla irradiazione corporea totale (TBI >5Gy singola o > 8 Gy frazionata) o dalla

presenza di busulfano a dose > 8 mg/Kg in combinazione con altri chemioterapici (fludarabina e thiotepa o ciclofosfamide); il regime di condizionamento ad intensità ridotta è invece caratterizzato da una notevole variabilità nella combinazione di chemioterapici e di basse dosi di irradiazione corporea. Entrambi determinano citopenia più o meno severa nel ricevente e necessitano sempre del supporto di cellule staminali del donatore per il recupero ematologico; il condizionamento non mieloablativo non determina citopenia nel ricevente e potrebbe anche non essere supportato dalle cellule staminali del donatore. Il regime di condizionamento ad intensità ridotta ha permesso di allargare la procedura trapiantologica ai pazienti di età superiore ai 55 anni (limite massimo per il condizionamento mieloablativo) o di età inferiore ai 55 anni ma con comorbidità tali da non poter sostenere un condizionamento mieloablativo.

La differenza fondamentale tra condizionamento mieloablativo e ad intensità ridotta è l'immunodeficienza che ne deriva che è molto più pronunciata nel primo caso, con conseguente maggior rischio di sviluppare complicanze infettive nel periodo post-trapianto.

Il condizionamento RIC porta alla formazione di una "chimera" . Il trapianto di midollo allogenico con condizionamento RIC può essere eseguito anche in pazienti con età avanzata.

### 3.4 Attecchimento

Il numero dei leucociti comincia a risalire dopo 10-20 giorni dall'infusione, raggiungendo valori di sicurezza entro due-tre settimane dal trapianto stesso. Per convenzione si definisce "attecchimento" il periodo in cui nel sangue periferico i granulociti neutrofili superano stabilmente il valore di 500/mm<sup>3</sup> e le piastrine di 25000/mm<sup>3</sup>, livelli ancora ridotti ma indicativi di ripresa midollare, in quanto la presenza di cellule mature nel sangue periferico riflette l'attività dei loro precursori nel midollo osseo. E' necessario distinguere tra attecchimento ematologico e quello immunologico, infatti , il primo viene monitorato con l'emocromo che definisce il valore dei polimorfonucleati (PMN), delle piastrine e dei reticolociti a livello del sangue periferico, mentre il secondo compare più tardivamente e viene monitorato attraverso il fenotipo linfocitario che valuta la ricostituzione dei linfociti (Ly) B, T, e delle cellule Natural killer (NK).(22)

### 3.5 Le complicanze post trapianto

Le principali complicanze post-trapianto sono rappresentate da:

- reazione del trapianto verso l'ospite (GVHD) acuta, la cui intensità varia da 0-I a II,III,IV secondo la classificazione di Glucksberg; il grado III e IV sono gravati da una percentuale di mortalità superiore al 70%; per definizione l'insorgenza di

GVHD

acuta

si

verifica dal giorno 0 al giorno +100, tuttavia manifestazioni di GVHD acuta si possono avere anche dopo il giorno +100 con le medesime caratteristiche e si tratta di GVHD acuta “de novo”, se non si era mai manifestata in precedenza oppure ricorrente o persistente se era già presente; (23)

- reazione del trapianto verso l’ospite (GVHD) cronica, limitata o estesa, per definizione presente dopo il giorno +100 post- trapianto. La presenza di sintomi di GVHD acuta in presenza di GVHD cronica è definita “overlap” GVHD; (24)
  
- le infezioni: virali (Citomegalovirus, virus di Epstein Barr, HSV, HHV6, BK e JC), batteriche e fungine; (25)
  
- le complicanze precoci di origine endoteliale (hepatic veno- occlusive disease, capillary leak syndrome, HSCTassociated thrombotic microangiopathy); (26)
  
- le neoplasie secondarie o complicanze tardive.

Bisogna infine ricordare che il paziente sottoposto a trapianto di midollo osseo rimane soggetto al rischio di recidiva della malattia di base.

### **3.6 Fattori di rischio per lo sviluppo di complicanze post trapianto**

I principali fattori di rischio per lo sviluppo delle complicanze post-trapianto possono essere classificati in due gruppi:

1. Fattori di rischio legati all'ospite:

- età superiore a 50 anni
- fase di malattia avanzata al momento del trapianto
- infezioni in atto
- presenza di comorbidità
- numero di cicli di chemioterapia precedenti il trapianto
- pregresso trapianto autologo
- pregresso trapianto allogenico

2. Fattori di rischio legati al trapianto:

- tipo di trapianto (donatore familiare/alternativo)
- sorgente di cellule staminali (periferiche/midollari/cordonali)
- tipo di condizionamento (RIC/MAC)
- utilizzo della globulina antilinfocitaria (ATG) per la prevenzione della reazione del trapianto contro l'ospite;
- presenza di reazione del trapianto contro l'ospite (GVHD).

### **3.7 Le complicanze infettive nel paziente sottoposto a HSCTH**

Le complicanze infettive rappresentano una delle principali cause di morbilità e di mortalità nei pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo allogenico (27-29). Secondo il CIBMTR (Center for International Blood and Marrow Transplant Research) il 17% dei pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo allogenico da donatore non consanguineo muoiono a causa di complicanze infettive; si può dedurre che, escludendo gli eventi legati a recidiva della malattia di base, le infezioni arrivano a causare un terzo delle morti correlate al trapianto.

I principali fattori di rischio per lo sviluppo di complicanze infettive sono:

1. la fase di malattia al momento del trapianto (avanzata/precoce);
2. le comorbidità del paziente, valutate al momento del trapianto sulla base del "comorbidity index" (CI), che considera il livello di compromissione dei principali organi vitali (cuore, polmone, rene, fegato, tratto gastro-enterico), la presenza di infezioni in atto che richiedono terapia, la presenza di malattia infiammatorie croniche o autoimmuni, il diabete e in base a ciò si assegna un punteggio: i pazienti con score  $\geq 3$  hanno un rischio di mortalità trapiantologica significativamente superiore rispetto allo score  $\leq 2$  ;(30)
3. il grado della neutropenia, definita come neutrofili  $< 500/\text{mm}^3$  (o  $< 1000/\text{mm}^3$ , ma in rapida diminuzione). La neutropenia grave viene definita come conta assoluta dei granulociti  $< 100/\text{mm}^3$ ;

4. la durata della neutropenia, si definiscono ad alto rischio i pazienti che vanno incontro ad una fase di neutropenia di durata superiore a 10 giorni;
5. la perdita di integrità della barriera muco-cutanea, legata nella maggior parte dei casi alla presenza di mucosite indotta dal regime di condizionamento mieloablativo e in minima parte all'impiego di presidi endovascolari quali il catetere venoso centrale;
6. il regime di condizionamento mieloablativo, rispetto al regime di condizionamento ad intensità ridotta, predispone al rischio di complicanze infettive per il maggior grado di immunosoppressione che determina;
7. la profilassi della reazione del trapianto verso l'ospite (GvHD), in particolare l'uso della globulina antilinfocitaria nel trapianto da donatore non consanguineo;
8. Il tipo di trapianto, da donatore familiare, alternativo o da cordone ombelicale e la conseguente ricostituzione immunologica, che è molto più precoce nel trapianto da donatore familiare rispetto al donatore alternativo.

Nel periodo post-trapianto si possono distinguere tre periodi nei quali insorgono le complicanze infettive (31):

1. fase precoce o della neutropenia (dal giorno 0 all'attecchimento).

In questa fase sono presenti tutti i fattori di rischio per infezioni; infatti, anche se la neutropenia e la distruzione delle barriere anatomiche sono i fattori di rischio



più rilevanti in questa fase, sono presenti anche immunodeficienza cellulare, umorale e asplenia funzionale nei pazienti sottoposti a irradiazione corporea totale. I principali patogeni osservati in questa fase sono batteri Gram positivi e Gram negativi, *Candida spp.* e gli *Herpes simplex virus*. I principali tipi di infezione sono batteriemia, polmonite, faringite, sinusite, proctite, cellulite;

2. fase intermedia (dal giorno +30 al giorno +100). Questa fase inizia al momento dell'attecchimento del trapianto va avanti fino al giorno +100. In questa fase la mucosite e la neutropenia sono scomparse, mentre rimangono l'immunodeficienza cellulare e umorale a causa dell'immaturità linfocitaria e l'asplenia funzionale se il paziente è stato sottoposto a irradiazione corporea totale. Inoltre l'immunodeficienza può essere ulteriormente aggravata dall'insorgenza di reazione del trapianto verso l'ospite e dalla terapia della stessa. I principali responsabili di infezioni in questa fase sono *Cytomegalovirus*, *Adenovirus*, *BK polyomavirus*, virus respiratori, *Pneumocystis jirovecii*, *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* e altri funghi. In particolare, mentre in passato *Cytomegalovirus* rappresentava la principale complicanza infettiva in questa fase (32), oggi assume un maggior rilievo l'aspergillosi invasiva, che è osservata nel 5-15% dei pazienti trapiantati ed è gravata da un elevato tasso di mortalità(33);

3. fase tardiva post-trapianto (dal giorno +100). In questa fase il rischio di infezione è principalmente associato allo sviluppo e alla severità della reazione del trapianto verso l'ospite, che impedisce la normale ricostituzione dell'immunità umorale e cellulare. Le infezioni che prevalgono in questa fase

sono sostenute da batteri capsulati (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*), *Aspergillus spp.* e altri funghi, *Pneumocystis jiroveci* e virus della *Varicella zoster*.

#### **4. TERAPIE ANTIVIRALI E RESISTENZE**

Esistono due strategie attualmente in uso per la prevenzione della malattia da CMV: la profilassi e la terapia “pre-emptive” (34). La prima consiste nella somministrazione di farmaci ad azione antivirale in pazienti senza infezione da CMV. Può essere iniziata nei primi 10 giorni dopo il trapianto e continuata generalmente per i primi tre mesi. La seconda invece prevede il monitoraggio della DNAemia mediante PCR ad intervalli regolari (generalmente settimanali) e l’inizio del trattamento in caso di riscontro di infezione da CMV.

Per quanto riguarda le terapie contro le infezioni da CMV nei pazienti trapiantati di midollo osseo vengono utilizzati tre tipi di farmaci: Ganciclovir/Valganciclovir, Foscarnet e Cidofovir. I pazienti sono monitorati almeno una volta a settimana per i primi 100 giorni post-trapianto mediante PCR quantitativa. Solitamente la terapia ha una durata di 100 giorni e viene sospesa dopo due risultati di PCR negativi consecutivi. Ad oggi non c'è ancora uniformità nella scelta del valore soglia della DNAemia per l'inizio della terapia pre-emptive (PET) che rimane pertanto Centro-dipendente (34); i clinici dell'U.O. Ematologia del Policlinico San Martino utilizzano come cut-off di riferimento le 10.000 U.I./ml, mentre per i

trapianti di organo solido (SOT) il cut-off è di 100.000 U.I./ml. Le regioni genomiche interessate dall'azione dei farmaci sono la UL97 (codoni 400-650) e la UL54 (codoni 300-1000)(34). Mutazioni nella regione UL97 riguardano principalmente il Ganciclovir, mentre le resistenze al Foscarnet e al Cidofovir sono associate alla regione UL54. Il gene UL97 codifica una fosfotransferasi virale (pUL97) che fosforila il Ganciclovir a monofosfato (35). L'attività antivirale del Ganciclovir è il risultato dell'inibizione della sintesi del DNA virale; viene utilizzato quando il paziente ha un numero di cellule positive al CMV inferiore a 4 (o una carica virale >10.000 U.I./ml) e non presenta pancitopenia. Il Valganciclovir è un profarmaco del Ganciclovir, ovvero dopo somministrazione orale è metabolizzato in modo rapido ed esteso a Ganciclovir dalle esterasi epatiche ed intestinali. Il Foscarnet è un analogo organico di un pirofosfato inorganico che inibisce, reversibilmente e non competitivamente, l'attività della pUL54, la DNA-polimerasi virale. Si somministra nel caso in cui il paziente risultasse positivo con una quantità di cellule superiore a 4 (o una carica virale > 10.000 U.I./ml) e non presentasse pancitopenia. Il maggior effetto collaterale a carico di questi farmaci è la tossicità renale, bisogna quindi monitorare la funzionalità renale del paziente con controlli periodici.

La probabilità di resistenza ai farmaci dipende da varie componenti, ad esempio

il tipo di paziente, la terapia prolungata o poco efficace, la carica virale all'inizio della terapia. Si sospetta resistenza alla terapia se la carica virale non diminuisce nonostante la terapia in corso, o quando c'è una ripresa virologica, oppure quando persiste uno stato di malattia nonostante il trattamento farmacologico sia stato prolungato. Le percentuali di fallimenti virologici per il CMV sono molto basse rispetto al numero di pazienti trattati.

La pUL97 è richiesta per la fosforilazione dei residui di treonina e serina di varie proteine cellulari ed è essenziale per la replicazione del virus. pUL97 ha un ruolo cruciale nella fosforilazione del Ganciclovir. Il 95% delle resistenze al Ganciclovir sono dovute a una o più mutazioni in questa regione. Le mutazioni più importanti sono M460I/V, H520Q, C592G, A594V, L595S E C603W. Le mutazioni di singole basi associate a resistenza sono difficili da distinguere dai naturali polimorfismi. (35)

Il gene UL54 codifica la DNA polimerasi, le mutazioni associate a questa regione sono meno comuni. La delezione dei codoni 981-982 nella regione V causa resistenza a tutti i farmaci. Le mutazioni più frequenti associate a resistenza a Ganciclovir e Foscarnet sono V781I, L802M e A809V. I polimorfismi in questa regione sono molto difficili da distinguere dalle reali mutazioni.(35)

**TABLE 8.** Ganciclovir resistance levels associated with UL97 genotypes by Fold change in ganciclovir EC50<sup>a</sup>

Genotype frequency	5–15×	2–5×	<2×
Most common	M460V/I, H520Q, A594V, L595S, C603W	C592G	
Less common at codons 460, 590–607	M460T, A594G, 595del, <sup>b</sup> 596del, L595F/W, K599T, C603R, C607Y, del(≥3) <sup>c</sup>	A594E/T, E596G, C603S, 600del, <sup>b</sup> C607F	A591V, N597D, K599E/R, L600I, 600del, <sup>b</sup> T601M, D605E <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Moderate resistance (5–15×), low-grade resistance (2–5×), or insignificant resistance (<2×).

<sup>b</sup> del=in-frame deletion of single codon; del2=deletion of two codons.

<sup>c</sup> In-frame deletion of ≥3 codons in the 590–607 range can be assumed to confer moderate ganciclovir resistance, although only a few examples have been phenotyped. Deletion of less than 3 codons may confer varying degrees of ganciclovir resistance.

<sup>d</sup> D605E is a baseline sequence polymorphism common in east Asia, unrelated to drug resistance.

Fig.7 mutazioni più comuni associate a resistenza al ganciclovir nella regione UL97

#### 4.1 Nuova profilassi da CMV nei pazienti sottoposti a trapianto allogenico

I pazienti CMV-positivi sottoposti a un trapianto di midollo osseo allogenico HSTC da donatore CMV-negativo sono ad alto rischio di riattivazione del virus. L'infezione da CMV è infatti una complicanza clinica significativamente rilevante in questi pazienti, poiché la riattivazione del virus post trapianto è associata a un incremento della mortalità. Gli unici strumenti, ad oggi disponibili, per la prevenzione dell'infezione da CMV sono i farmaci indicati per il trattamento della malattia da CMV. Questi, però, nei pazienti sottoposti a trapianto HSTC, hanno dimostrato di causare complicanze anche gravi legate ai loro effetti indesiderati (epatopatie). Dall'8 gennaio 2017 la Commissione Europea ha autorizzato la casa farmaceutica MSD di commercializzare un nuovo farmaco (PREVYMIS-LETtermovir). Il Letermovir è il primo farmaco indicato per la profilassi della riattivazione dell'infezione e della malattia da CMV nei pazienti trapiantati di cellule staminali ematopoietiche.(36)

Il farmaco presenta un nuovo meccanismo d'azione: blocca l'enzima del CMV denominato "terminasi", necessario per il clivaggio e impacchettamento del DNA della progenie virale (37). Il complesso delle terminasi virale (pUL89, pUL56 e pUL51) è responsabile del clivaggio del DNA in singole unità genomiche con il conseguente impacchettamento in procapsidi preformati. Attraverso l'inibizione delle regioni UL56 e UL89 il Letermovir blocca il processo di replicazione virale impedendo il clivaggio dei concatameri del DNA in unità genomiche dei procapsidi virali con accumulo di DNA virale immaturo, in questo modo il virus non riesce a svilupparsi correttamente e ad infettare altre cellule sane. L'antivirale può essere somministrato per via orale o endovenosa. La profilassi con PREVYMIS può essere iniziata il giorno stesso del trapianto e non oltre 28 giorni e deve continuare per 100 giorni dopo il trapianto; il prolungamento oltre 100 giorni dopo il trapianto potrebbe apportare un beneficio ad alcuni pazienti ad alto rischio di riattivazione tardiva del CMV. La sospensione del Letermovir in seguito a una DNAemia positiva a favore della terapia pre-emptiva avviene solo se la carica virale viene considerata clinicamente significativa (>10.000 U.I./ml). L'attività di questo farmaco è strettamente specifica per il CMV mentre manca di efficacia nei confronti degli altri Herpes virus e Adenovirus. A causa di questa unicità del meccanismo d'azione sembra improbabile una cross-resistenza con altri farmaci antivirali, mentre è stata dimostrata un'importante interazione farmacologica con la ciclosporina, farmaco immunosoppressore altamente somministrato nei pazienti ematologici, per cui in caso di co-somministrazione bisogna dimezzare le dosi di Letermovir o sospendere la ciclosporina (38).

## Letermovir, un meccanismo d'azione unico<sup>1</sup>

- Letermovir è il primo farmaco appartenente alla classe degli inibitori del complesso della terminasi virale del CMV, con attività unicamente indirizzata verso il CMV<sup>1</sup>
- Letermovir ha un meccanismo di azione unico, agendo nella fase finale della replicazione virale attraverso il legame e l'inibizione delle subunità UL56 e del complesso della terminasi virale UL89<sup>1</sup>
- Considerando l'unicità del meccanismo di azione, risulta improbabile una cross-resistenza con farmaci antivirali attualmente disponibili<sup>1</sup>

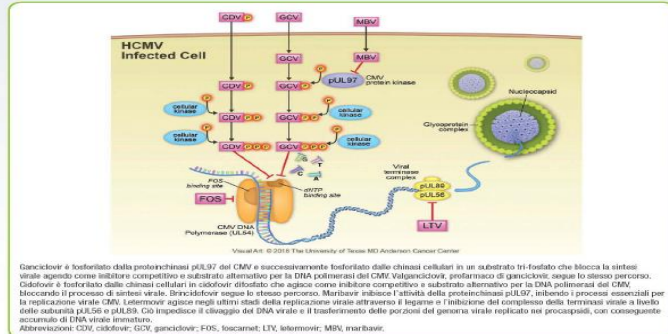


Figura 2 ref. 1

Fig.8 meccanismo d'azione Letermovir Prevymis

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

## Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation

F.M. Marty, P. Ljungman, R.F. Chemaly, J. Maertens, S.S. Dadwal, R.F. Duarte, S. Haider, A.J. Ullmann, Y. Katayama, J. Brown, K.M. Mullane, M. Boeckh, E.A. Blumberg, H. Einsele, D.R. Snyderman, Y. Kanda, M.J. DiNubile, V.L. Teal, H. Wan, Y. Murata, N.A. Kartsonis, R.Y. Leavitt, and C. Badshah

Fig.9 la prima review sul Letermovir , dicembre 2017

## Linee Guida NCCN

Profilassi della riattivazione o della malattia da CMV<sup>3</sup>



Fig.10 linee guida per la profilassi e il trattamento dell'infezione da CMV

## 5. OBIETTIVO DELLO STUDIO

Nel laboratorio dell'U.O. di Igiene vengono eseguiti i test diagnostici di routine sia per valutare lo stato sierologico del paziente pre-trapianto (di organo solido o midollo osseo) sia per monitorare l'insorgenza di infezioni virali dopo il trapianto; in particolare attraverso la sorveglianza di laboratorio il paziente viene controllato costantemente per diagnosticare in tempo l'eventuale riattivazione o malattia da CMV e per monitorare successivamente l'efficacia della terapia. Inoltre questi pazienti vengono monitorati anche per gli altri Herpes virus: EBV, HHV6-7-8, HSV1 e 2. Da marzo 2019 i medici dell'U.O. di Ematologia somministrano un nuovo farmaco, il Letermovir, come profilassi primaria nei pazienti sottoposti a



trapianto di midollo osseo allogenico con sierostato R+/D-. La sorveglianza di laboratorio di questi pazienti ha permesso di valutare l'efficacia di questo nuovo farmaco nel prevenire la riattivazione del Citomegalovirus.

## **6. POPOLAZIONE DELLO STUDIO**

L'attività diagnostica viene eseguita principalmente sui pazienti dell' U.O. di Ematologia del Policlinico San Martino, ma anche su pazienti di altri reparti (rianimazione, nefrologia, neurologia, malattie infettive). La valutazione dell'efficacia della profilassi primaria ha riguardato solamente una parte dei pazienti onco-ematologici, in particolare i trapiantati di midollo osseo allogenico con sierostato D-/R+ .

## **7. PREPARAZIONE CAMPIONI**

La metodica di estrazione (Abbott mp2000) prevede un volume minimo di partenza di 700 µl per tutti i tipi di fluidi biologici (sangue intero, plasma, broncolavaggio, espettorato, liquor, biopsie, broncoaspirato). Il gold standard per la rilevazione del Citomegalovirus è il sangue intero, poiché nel plasma, solitamente, il virus ha una carica virale minore e rimane in circolo più a lungo. Durante il monitoraggio dell'efficacia della terapia si raccomanda l'utilizzo della stessa metodica di PCR e dello stesso materiale biologico di partenza, per poter valutare in modo corretto il decorso della malattia.

## **8. TECNICHE DIAGNOSTICHE**

Il CMV è un virus estremamente termolabile, perde la propria infettività a 4°C oppure a 25°C in pochi giorni e a 56°C in 30 minuti, oppure a PH 5, o trattandolo con etere. Fino a poco tempo fa il monitoraggio della carica virale si basava principalmente su due tecniche: la PCR e l'antigenemia, tecnica ormai in disuso in quanto obsoleta.

Il test Abbott RealTime CMV impiega la tecnologia della PCR in combinazione con il rilevamento omogeneo in tempo reale della fluorescenza per la quantificazione di DNA di CMV.

Il kit di estrazione contiene :

- Elution Buffer
- mlysis buffer
- wash buffer 1
- wash buffer 2 da ricostituire in etanolo
- particelle magnetiche
- controllo interno
- controllo negativo
- controllo positivo



Fig.11 Estrattore e amplificatore Abbott mp2000

Poiché si tratta di pazienti estremamente delicati i campioni vengono processati giornalmente per poter refertare i risultati ottenuti entro 24-48 ore dopo. Ogni giorno viene eseguita una lista di lavoro che può arrivare fino a un massimo di 48 campioni. Nell'attesa dei campioni viene preparato lo strumento per l'estrazione (fig.11) che prevede l'utilizzo di puntali (da 1000 e da 200  $\mu$ l), 2 deep wells, il sacchetto dei rifiuti, le colonnine per l'eluizione, i bidoni per lo scarto, l'acqua di

lavaggio e le vaschette con ciascun reagente di estrazione.

La metodica di estrazione da sangue intero non prevede l'utilizzo della proteinasi. I campioni vengono caricati direttamente su appositi rack lasciando i primi due posti per i controlli negativo e positivo; le feci e le biopsie vengono pretrattate a mano prima di essere caricate. Una volta che lo strumento è pronto vengono seguite le istruzioni del computer dell'estrattore per poter avviare l'estrazione. Il processo di estrazione dura dalle due alle quattro ore a seconda del numero di campioni. A questo punto si procede con l'amplificazione, lo strumento viene nuovamente caricato con nuovi puntali, la piastra per la PCR e l'amplimix. L'estrattore procederà a dispensare prima la mix e poi gli eluati nei pozzetti della piastra, questo passaggio prevede 10 minuti. Infine viene esportata la seduta dall'estrattore all'amplificatore (fig.11) e viene caricata la piastra. L'amplificazione impiega due ore e mezza indipendentemente dal numero di campioni (39). Terminata la seduta vengono stampati i risultati e si procede con il controllo delle curve di ciascun campione per effettuare una prima analisi dei risultati ottenuti ed evitare falsi positivi. Successivamente, i risultati vengono ulteriormente confrontati con i risultati ottenuti precedentemente e se non vi è riscontro il campione viene ripetuto nella seduta successiva.

## **9. RISULTATI**

Da marzo 2019, insieme alla sorveglianza di laboratorio, in collaborazione con l'U.O. di Ematologia del Policlinico San Martino abbiamo valutato l'efficacia del Letermovir come profilassi primaria in 54 pazienti CMV+ sottoposti a trapianto di

midollo osseo allogenico da donatore CMV-negativo e abbiamo comparato, attraverso uno studio retrospettivo, l'outcome con 123 pazienti, anch'essi con sierostato R+/D-, a cui è stata somministrata la terapia antivirale standard (40).

Da gennaio 2017 a giugno 2019, 163 pazienti CMV+ con una malattia ematologica maligna sono stati sottoposti a trapianto di midollo allogenico. I donatori sono stati rispettivamente: fratello HLA-identico (SIB=29), non familiare (UD=15) o aploidentico (HAPLO=119). Il regime di condizionamento è stato mieloablativo per 148 pazienti, con busulfano in 80 pazienti, con radioterapia total body in 73 pazienti e con intensità ridotta in 10 pazienti. L'età mediana rilevata è di 51 anni. La profilassi primaria con il Letermovir è stata somministrata a 54 pazienti a una mediana di 14 giorni (range 7-28) dopo il trapianto allogenico fino a 100 giorni con una dose di 240 mg o 480 mg in assenza di ciclosporina. Tutti i pazienti avevano una viremia negativa al momento di inizio della profilassi.

Noi abbiamo monitorato i 54 pazienti una volta alla settimana mediante PCR dal giorno 0 al giorno 180 dopo HSTC. Per valutare l'efficacia della profilassi abbiamo utilizzato come riferimento i giorni 30, 60, 90, 120 e 180 dal trapianto. L'incidenza di infezione da CMV clinicamente rilevante (viremia tale da richiedere la terapia pre-emptiva o malattia da CMV) è stata pari all'0% nel gruppo Letermovir (Fig.12) e del 45% nel gruppo storico di controllo. Inoltre la mediana della riattivazione era intorno al 46esimo giorno dal trapianto con una mediana di DNAemia di 10042 U.I./ml. Nel gruppo Letermovir, invece, la mediana della DNAemia è stata di 75 U.I./ml; in un paziente abbiamo rilevato una carica virale di 12578 U.I./ml ma non è stato evidenziato un eventuale fallimento terapeutico.

Attualmente 40 pazienti hanno terminato la profilassi con Letermovir, 14 sono

ancora in corso e un solo paziente è uscito dallo studio a causa di una riattivazione da HHV6. La riattivazione del CMV dopo la sospensione del farmaco si è verificata solamente in due pazienti.

## **10. CONCLUSIONI**

Questo studio preliminare ci ha permesso di verificare come sia importante non solo la negatività sierologica nel monitoraggio dell'infezione da CMV, ma anche scegliere la terapia migliore per il singolo paziente per evitare un eventuale fallimento virologico. Il follow up costante durante la terapia permette di monitorare l'andamento della carica virale, e di conseguenza l'efficacia della terapia, escludendo o diagnosticando eventuali farmaco resistenze clinicamente rilevanti mediante il test di sequenziamento. La nuova profilassi, inoltre, permette di limitare al massimo la riattivazione dell'infezione da CMV e, allo stesso tempo, di curare tempestivamente eventuali recidive. Ad oggi il Letermovir sembra avere una minore tossicità rispetto agli altri farmaci antivirali in uso e non sono state evidenziate farmaco-resistenze clinicamente rilevanti. Ulteriori studi clinici sono attualmente in corso per allungare la profilassi a 200 giorni nei pazienti considerati ad alto rischio di recidiva della malattia. Tutto questo consente ai clinici di cercare il giusto equilibrio tra terapia profilattica pre-infezione e quella di routine post-infezione per limitarne al massimo i rischi legati sia alla terapia che all'infezione stesse.

L'incidenza totale della mortalità associata a trapianto dopo il 100esimo giorno è

stata 0% nel gruppo Letermovir contro un 8% nel gruppo di controllo: la causa di morte è stata GVHD acuta in 8 pazienti, MOF in 2 pazienti e malattia da CMV in 1 paziente. Quindi la profilassi con il Letermovir sembrerebbe avere un outcome favorevole, inoltre, i pazienti trattati hanno mostrato cariche virali molto più basse e non clinicamente rilevanti rispetto allo studio retrospettivo.

Ad oggi l'unica controindicazione evidenziata è la somministrazione del farmaco per via orale, e non ancora endovenosa, che causa un ritardo nell'inizio della profilassi (dal giorno 9) proprio per la difficoltà di assorbimento mostrata dai pazienti nei primi giorni dopo il trapianto (40).

### Clinically Significant CMV Infection

FIG. 1

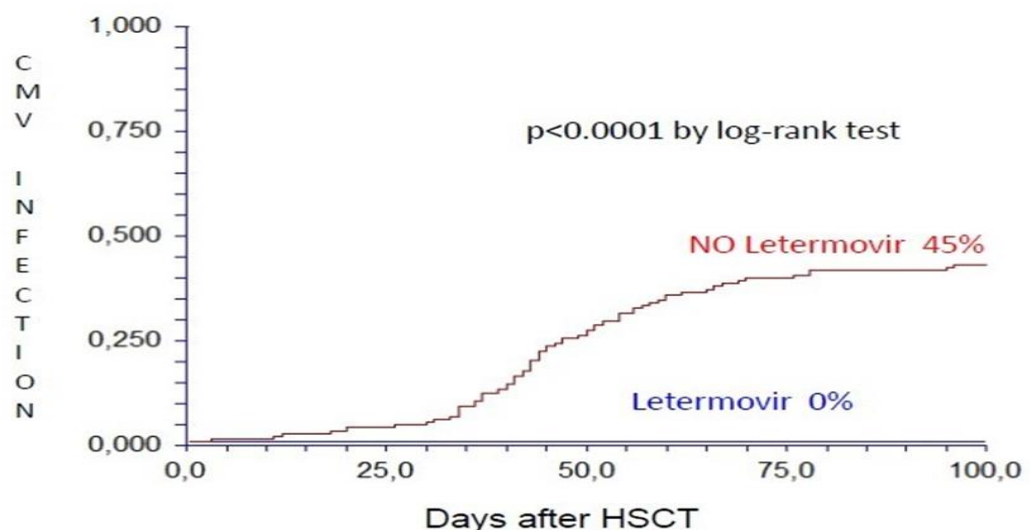


Fig.12 Dominietto A. et al, EBMT 2019 (40)

### Viral Load According To Letemovir Prophylaxis

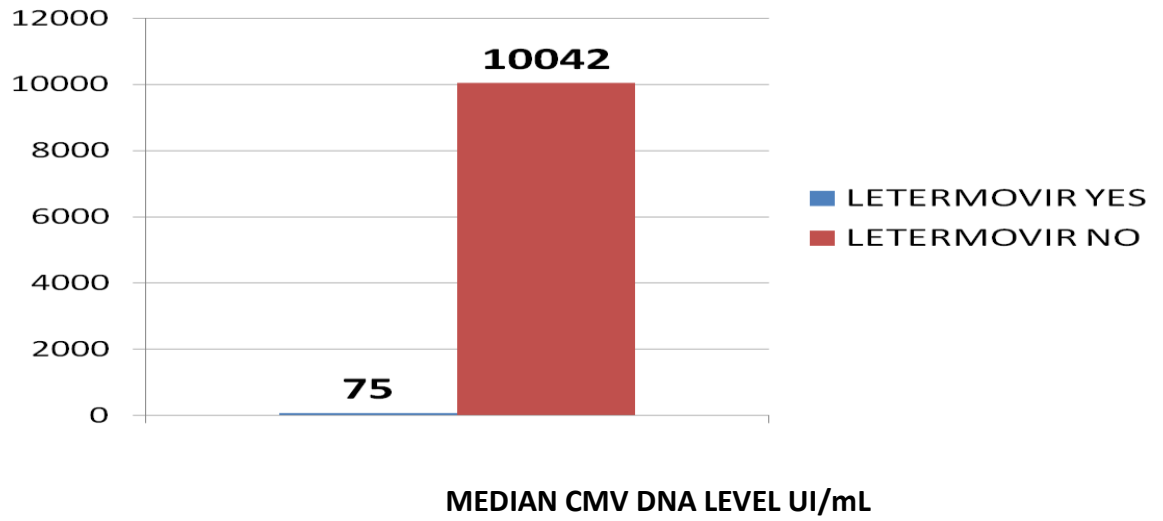


Fig.13 Dominietto A. et al, EBMT 2019 (40)

### PATIENTS CHARACTERISTICS 1

LETERMOVIR	YES n=40	NO n=123
AML	23	51
ALL	6	20
MDS	2	15
HD	2	3
NHL	4	11
other	3	23
MEDIAN AGE yy	59 (24-72)	53 (18-70)
YY of TX	2019	2017-2019
1° and 2° CR/>3°CR or ADV DIS	21/19	92/31
CMV +/-	16 (40%)	37(30%)

### PATIENTS CHARACTERISTICS 2

LETERMOVIR	YES n=40	NO n=123
TBF 3gg/TBI/TMI	22	51
TBF 2gg	16	64
NMA	2	8
HLA-ID-SIB	3	26
HAPLO	33	86
MUD/MM	4	11
BM	34	94
PB	6	29
MEDIAN FUP (dd)	228	737

Tab. 1 e 2 Caratteristiche dei due gruppi (yes=Letemovir, no=restrospettivo)



## 11. BIBLIOGRAFIA

1. [www.microbiologia.unige.it](http://www.microbiologia.unige.it)
2. [www.issalute.it](http://www.issalute.it)
3. Roizman B., Carmichael L.E., et al : Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature and taxonomy. Intervirology 1981;16:201-2017
4. Weller Th., Hanshaw J.B., Scott D.E.: Serological differentiation of viruses responsible for Cytomegalic inclusion disease. Virology,1960; 12:130-13
5. Apperley JF., Goldman JM. Citomegalovirus: biology, clinical feature and methods for diagnosis. Bone Marrow Transplantation. (1988)
6. Maria Grazia Revello, Elena Percivalle, Eloisa Arbustini, Ruggero Pardi, Silvano Sozzani, and Giuseppe Gerna: In Vitro Generation of Human Citomegalovirus pp65 Antigenemia, Viremia, And LeukoDNAemia.
7. Chee M. Sequence analysis of herpesvirus genome-Progress in Cytomegalovirus research. Ed. M.P Landini. ICS 978. (1991).
8. Stagno S., Pass R.F., Dworsky M.E., Alford C.A. jr: Maternal Cytomegalovirus infection and perinatal transmission. Clin obstet. Jenechol. 1982;25:563-76
9. Elek S.D., Stern H. : Development of vaccine against mental retardation caused by Cytomegalovirus infection in utero. Lancet 1974; 1; 1-5
10. Dal Monte P.,Mugnani M. Citomegalovirus umano (1990), 2: 67-69
11. Ripeto D., Silini E., Parea M. E al. Identification of Human cytomegalovirus isolates by the polymerase chain reaction. Microbiologia (1990), 13: 297-304.
12. Landini MP., Rugolo M. Increased accumulation of lipophilic (tetraphenylphosphonium) in human embryo-blast after infection with

- cytomegalovirus. *J. Gen Virology*. (1984), 65: 2269-2272
13. Rugolo M., Baldassarri B., Landini MP. Changes in membrane permeability in cells infected by human Cytomegalovirus. *Arch. Virol.* (1985), 89: 203-212
  14. Lazzaratto T, Guerra B, Lanari M, Gabrielli L, Landini MP, Infezione congenita da Citomegalovirus: possibilità significative della diagnostica di laboratorio. *LigandAssay* 10 (1) 2005.
  15. Landini MP. Il Citomegalovirus umano. *Rec. Prog. Med.*(1981),
  16. George B, Pati N, Ratnamohan M, Huang G, Kerridge I, Hertzberg M, Gottlieb D, Bradstock K. "Pre-transplant cytomegalovirus (CMV) serostatus remains the most important determinant of CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of surveillance and preemptive therapy *Transpl Infect Dis.* 2010 Aug 1;12(4):322-9. doi: 10.1111/j.1399-3062.2010.00504.x. Epub 2010 May 11.
  17. [www.ministerosalute.it/cnt](http://www.ministerosalute.it/cnt)
  18. A. Gratwohl, H. Baldomero, K. Frauendorfer "Results of the EBMT Activity Survey 2005 on Haematopoietic Stem Cell Transplant: Focus on Increasing Use of Unrelated Donors" *Bone Marrow Transplant* 2007; 39: 71- 78
  19. Gluckman E, Rocha V, Arcese W et al. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp Hematol.*2004, 397-407
  20. W. Arcese, A. P. Iori *Ematologia "il trapianto di cellule staminali emopoietiche allogeneiche"* Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia Università "La Sapienza"-Roma
  21. Andrea Bacigalupo, Karen Ballen, Doug Rizzo et al. Defining the Intensity of

- Conditioning Regimens: Working Definition. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009, 1628-33
22. Porta F, Locatelli F, Burgio GR. Hematopoietic stem cell transplantation: 40 years of continuous progress and evolution. *Haematologica*. 2008; 93 (11): 1607-10
  23. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P et al. Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant* 1995, 825-8
  24. Greinix HT, Loddenkemper C, Pavletic SZ et al. Diagnosis and staging of chronic graft-versus-host disease in the clinical practice. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011, 167-75
  25. Gratwohl A, Brand R, Frassoni F et al. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant*. 2005, 757-69
  26. Carreras E, Diaz-Ricart M. The role of the endothelium in the short-term complications of hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2011, 1495-502
  27. Marena C, Zecca M, Carenini ML, et al. Incidence of, and risk factors for, nosocomial infections among hematopoietic stem cell transplantation recipients, with impact on procedure-related mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2001, 510-517
  28. Poutsika DD, Price LL, Ucuzian A et al. Blood stream infection after hematopoietic stem cell transplantation is associated with increased mortality. *Bone Marrow Transplant* 2007, 63-70
  29. Cappellano P, Viscoli C, Bruzzi P et al. Epidemiology and risk factors for

- bloodstream in-fectious after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.  
New Microbiol.2007, 89-99
30. Mohamed L. Sorrow, Michael B. Maris, Rainer Storb et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. Blood 2005,2912-19
  31. Tomblyn M, Chiller T. Einsele H et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients; a global perspective. Bone Marrow Transplant. 2009, 453-5
  32. Ljungman P, de la Camara R, Cordonnier C et al. Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. Bone Marrow Transplant 2008, 227-43
  33. Maertens J, Marchetti O, Herbrecht R et al. European guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients: summary of the ECIL3-2009 update. Bone Marrow Transplant 2011, 709-18
  34. Ljungman P, de la Camara R, Robin C, Crocchiolo R, Einsele H, Hill A.J, Navarro D, Cordonnier C, Ward N K, on behalf of the European Conference on Infections in Leukaemia group, Guidelines for the management of cytomegalovirus infections in patients with haematological malignancies and after stem cell transplantation from the 2017 European Conference on Infections in Leukemia (ECIL 7)
  35. Kotton N. C, Kumar D, Caliendo M A, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, and Atul Humar, on behalf of the Transplantation Society International CMV Consensus Group, Updated International Consensus Guidelines on the

Management of Cytomegalovirus in Solid-Organ Transplantation, *Transplan.* 2013,113-190

36. Marty FM, Ljungman P, Chemaly RF, et al. Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 2017
37. Deleenheer B, Spriet I and Maertens J, Pharmacokinetic drug evaluation of Letermovir prophylaxis for cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplantation, 2018
38. Kropf D, von Richter O, Stobernack H-P, et al. Pharmacokinetics and Safety of Letermovir Coadministered With Cyclosporine A or Tacrolimus in Healthy Subjects. *The Journal of Clinical Pharmacology.* 2017, 0:1-13
39. Istruzioni operative "U.O. Igiene", nuovi laboratori Policlinico San Martino
40. Prophylaxis therapy with Letermovir in CMV seropositive patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: real life experience, Dominietto A., Guarona G., Galano B., Bruzzone B., Angelucci E., *EMT* 20