

# Monitoraggio della carica virale dell'EBV nei linfomonociti e nel siero di trapiantati renali mediante un protocollo di PCR quantitativa

C. Merlino<sup>1</sup>, F. Giacchino<sup>2</sup>, M. Bergallo<sup>1</sup>, F. Bonello<sup>2</sup>, C. Bollero<sup>1</sup>, G.P. Segoloni<sup>3</sup>, R. Cavallo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dip. Sanità Pubblica e Microbiologia, S.C. Virologia, Università di Torino, Torino

<sup>2</sup> Dip. di Nefro-Urologia, U.O.A. Nefrologia e Dialisi, Ospedale Civile, Ivrea (TO)

<sup>3</sup> Dip. Medicina Interna, Unità Trapianto Renale, Università di Torino, Torino

## Riassunto

**Premesse.** I disordini linfoproliferativi post-trapianto (PTLD) che consistono in un ampio spettro di manifestazioni, dall'iperplasia linfoide ai linfomi, costituiscono, nei portatori di trapianto d'organo, una grave complicanza la cui incidenza è dell'1-20% a seconda dell'organo trapiantato e dell'età del paziente. È stata descritta una correlazione tra l'infezione da virus di Epstein-Barr (EBV), il grado ed il tipo di immunodepressione e l'insorgenza di PTLD. La valutazione della carica virale dell'EBV nel sangue periferico di portatori di trapianto d'organo sembra essere un utile indicatore prognostico del rischio di PTLD ed un valido strumento di diagnosi. In numerosi studi, è stato osservato che lo sviluppo di PTLD è accompagnato da un aumento significativo della quantità di EBV-DNA nel sangue periferico dei pazienti affetti da tale sindrome. Nel presente lavoro sono riportati i risultati ottenuti nel monitoraggio mensile, per 6 mesi, della carica virale dell'EBV in 15 pazienti portatori di trapianto renale. Il numero delle copie di EBV-DNA (genomi virali) è stato determinato nei linfomonociti e nel siero mediante un protocollo di PCR quantitativa.

**Metodi.** Il protocollo di quantificazione dell'EBV-DNA messo a punto nel nostro laboratorio prevede uno screening mediante PCR semi-quantitativa dei campioni contenenti un elevato numero di copie genomiche di EBV ( $\geq 1000$  copie/ $10^5$  linfomonociti o 100  $\mu$ L di siero) seguito da una più precisa quantificazione dei soli campioni significativi mediante PCR quantitativa-competitiva (QC-PCR).

**Risultati.** I 15 portatori di trapianto renale da noi studiati non hanno sviluppato PTLD né patologie acute ricorrenti né rigetto acuto durante lo studio. I risultati ottenuti durante il monitoraggio semestrale della carica virale di EBV nei campioni di linfomonociti confermano l'andamento fluttuante nei pazienti asintomatici riportato in letteratura. In particolare, 5/14 (35.7%) dei pazienti EBV sieropositivi ha presentato un numero di copie di EBV-DNA pari a 1000 copie/ $10^5$  linfomonociti, e 1/14 (7.1%) ha raggiunto il valore di 5000 copie/ $10^5$  linfomonociti, almeno una volta durante lo studio. Nel paziente EBV sieronegativo, l'EBV-DNA nei linfomonociti non è mai stato dimostrato ( $< 100$  copie/ $10^5$  linfomonociti). La carica virale di EBV in tutti i campioni di siero dei 15 pazienti studiati è sempre stata inferiore al valore soglia del nostro protocollo di quantificazione ( $< 100$  copie/100  $\mu$ L). Per quanto riguarda la terapia immunodepressiva, e da notare che il 66.7% dei 6 pazienti nei quali l'EBV-DNA ha raggiunto valori uguali o superiori alle 1000 copie/ $10^5$  linfomonociti erano in trattamento con tacrolimus (FK506), mentre solo il 33.3% erano in trattamento con ciclosporina A (CyA).

**Conclusioni.** Dato l'elevato valore predittivo positivo della carica virale di EBV nel sangue periferico per la diagnosi di PTLD, riportato da numerosi Autori, e la riportata mancanza di correlazione tra l'evidenza sierologica di riattivazione dell'infezione da EBV e la carica virale di EBV, la determinazione della carica virale nei linfomonociti e nel siero, mediante tecniche di PCR quantitativa, costituisce un valido strumento diagnostico per il monitoraggio dei pazienti trapiantati a rischio di sviluppare PTLD.

**PAROLE CHIAVE:** Q-PCR, EBV, Trapiantati renali

## Epstein Barr viral load monitoring in renal transplant recipients

**Background.** Post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD), ranging from lymphoid hyperplasia to clonal malignancy, are severe complications arising in solid organ transplant patients; their reported incidence ranges from 1 to 20%, according to factors such as type of transplanted organ and age of recipients. A strong correlation between Epstein-Barrvirus (EBV) infection, the grade and type of immunosuppression and the development of PTLT has been recognized. The detection and quantification of EBV-DNA load in peripheral blood have been utilized as prognostic markers for the development of PTLT, showing a correlation between high levels of EBV-DNA in the blood and the development of PTLT. In this study, we monthly monitored EBV viral load in 15 renal transplant recipients for six months. The number of EBV-DNA copies was measured in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and serum samples by a quantitative PCR protocol developed in our laboratory.

**Methods.** Our EBV-DNA quantification protocol employs a previous screening of samples containing a significant number of viral DNA copies ( $\geq 1000$  copies/ $10^5$  PBMC or 100  $\mu$ L serum) by semi-quantitative PCR followed by a precise quantification of the only significant samples by quantitative-competitive (QC)-PCR.

**Results.** Our 15 renal transplant patients neither developed PTLT nor had recurrent acute illnesses or acute graft rejections during the study. The results obtained in the monthly follow up of EB viral load in PBMC samples confirmed its fluctuation in asymptomatic patients reported in the literature. In particular, 5/14 (35.7%) of EBV seropositive patients had an EBV-DNA load equal to 1000 EBV copies / $10^5$  PBMC, and 1/14 (7.1%) reached 5000 EBV copies / $10^5$  PBMC at least once in our study. In the EBV seronegative patient, EBV-DNA in PBMC samples was always undetectable (less than 100 DNA copies/ $10^5$  PBMC). EBV-DNA load in all serum samples was less than threshold value of our quantification protocol ( $< 100$  DNA copies/100  $\mu$ L serum). With regard to the immunosuppressive treatment, it should be noted that 66.7% of the six patients in whom EBV load reached values equal to or higher than 1000 DNA copies/ $10^5$  PBMC, were on FK506 whereas only 33.3% of them were on CyA.

**Conclusions.** Since the high positive predictive value of EB viral load in peripheral blood for diagnosis of PTLT reported by several Authors, and the described absence of correlation between the serological evidence of EBV reactivation and EB viral load, EBV viral load measurement in PBMC and serum samples using quantitative PCR techniques is a powerful diagnostic tool to monitor transplanted patients at risk of developing PTLT. (*G Ital Nefrol* 2003; 20: 170-5)

**KEY WORDS:** Q-PCR, EBV, Renal transplant patients