

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

Scienze medico-chirurgiche gastroenterologiche e dei trapianti

Ciclo XXI

Settore scientifico disciplinare di afferenza: MED 18

**MONITORAGGIO IMMUNOLOGICO CON CYLEX
NEL TRAPIANTO DI FEGATO**

Presentata da: Dott. Matteo Ravaioli

Coordinatore Dottorato:

Prof. Massimo Campieri

Relatore:

Prof. Gian Luca Grazi

Esame finale anno 2009

Introduzione

Il “target” ottimale di immunosoppressione nel paziente trapiantato con organi solidi (fegato, cuore, rene, pancreas, intestino e multi-viscerale) rappresenta da molti anni l’obiettivo di molti ricercatori e medici che lavorano nel settore della trapiantologia.

L’immunosoppressione permette di prevenire il rigetto dell’organo trapiantato, ma espone il paziente ad un rischio aumentato di infezioni, nuove neoplasie ed in alcuni casi di recidiva della malattia di base.

E’ necessario poi considerare gli effetti collaterali del tipo di immunosoppressore che si utilizza e sebbene siano stati fatti molti progressi in tale settore, due rimangono i farmaci protagonisti della maggior parte dei protocolli immunosoppressivi: il tacrolimus e la ciclosporina (figura 1 e referenza 1).

Questi due farmaci chiamati inibitori della calcineurina per il loro meccanismo di azione (figura 2) hanno notevolmente ridotto il numero di rigetti nei pazienti sottoposti a trapianto di organo solido, migliorando la sopravvivenza del “graft” e dei pazienti.

I farmaci inibitori della calcineurina (CNI), ciclosporina e tacrolimus, costituiscono pertanto i pilastri dell’immunosoppressione (2-3) e nonostante la loro efficacia nel controllare il rigetto d’organo e nel determinare lunghe sopravvivenze di paziente e “graft”, molte problematiche cliniche, tra cui la nefro- e neuro tossicità, tumori de novo, e per quanto riguarda il trapianto di fegato, la recidiva dell’epatocarcinoma (HCC) e dell’epatite HCV correlata, rimangono aperte.

Per tale motivo sono stati studiati ed immessi nella pratica clinica farmaci con caratteristiche diverse da quelle dei CNI, allo scopo di ridurre o sospendere la somministrazione degli stessi.

Gli inibitori dell’m-TOR (sirolimus ed everolimus) sono tra le sostanze di nuova generazione che più di altre destano interesse per la loro applicazione nella trapiantologia clinica.

Sirolimus ed everolimus sono lattoni macrociclici caratterizzati da potente attività antiproliferativa ed immunosoppressiva. Questi farmaci bloccano l'attivazione dei linfociti T ad uno stadio più avanzato rispetto a quello dei CNI, inattivando l'enzima "*Mammalian Target Of Rapamycin*" (m-TOR) ed inibendo i segnali mediati dall'interleuchina 2 (IL-2), con arresto del ciclo cellulare in fase G1 (figura 2 e referenza 4).

Nel trapianto di fegato l'immunosoppressione è particolarmente problematica nei riceventi HCV positivi e/o affetti da HCC, in quanto un'immunosoppressione troppo aggressiva può favorire una recidiva severa di infezione e/o della malattia neoplastica (5-6).

Purtroppo fino ad oggi, l'unico strumento utilizzato per valutare il tipo di immunosoppressione è il dosaggio dei farmaci a livello sierico, che del resto non permette di comprendere in grado di immunodepressione del paziente.

Quello che andrebbe ricercato è uno strumento che misuri l'immunocompetenza del paziente in base alla quale possa essere individualizzata l'immunosoppressione.

E' necessario un utilizzo razionale degli immunosoppressori, al fine di prevenire da un lato una over-immunosoppressione, che espone il paziente a rischio di infezioni opportunistiche ed effetti tossici da farmaci, e dall'altro una immunosoppressione insufficiente che esporrebbe al rischio di rigetto del "graft".

Tuttavia occorre considerare che per gli inibitori della calcineurina non esistono range terapeutici di riferimento, e il livello plasmatico del farmaco non correla con l'efficacia immunosoppressiva; inoltre questi test non considerano l'effetto combinato di altri immunosoppressori, come gli steroidi e gli antimetaboliti, né l'impatto di altri fattori che influiscono sullo stato immunitario, come le condizioni cliniche del paziente, il background genetico, il sesso, l'età, il trauma chirurgico e l'anestesia .

Fino a poco tempo fa, non erano disponibili test che valutavano direttamente lo stato immunologico dei pazienti trapiantati, tenendo in considerazione anche gli effetti cumulativi di questi complessi fattori.

Un nuovo strumento che sembra efficace è il test Cylex ImmunoKnow, approvato dalla FDA nel 2002 per la determinazione dell'immunità cellulo-mediata nei pazienti trapiantati (7).

Il test misura la capacità dei linfociti CD4+ di rispondere a stimolazione mitogenica con fitoemoagglutinina-L (PHA) in vitro, quantificando la quantità di adenosina trifosfato (ATP) prodotta dalle cellule CD4+ dopo stimolazione. Tale test è stato valutato in studi retrospettivi osservazionali al fine di rilevare la correlazione con: rischio di rigetto, infezioni, recidiva di HCV dopo trapianto di fegato e capacità del test di predire la risposta virologica nei pazienti sottoposti a trattamento antivirale (8).

Lo studio descritto nella presente tesi è finalizzato a valutare l'efficacia del test Cylex nella gestione clinica dei pazienti trapiantati di fegato.

Il risultato del test sarà correlato agli eventi avversi dopo il trapianto quali le infezioni e il rigetto d'organo. Un gruppo di pazienti sarà poi gestito utilizzando il test Cylex, mentre un altro gruppo eseguirà il test senza conoscerne il risultato, valutando le differenze di sopravvivenze e di complicanze dei due gruppi.

Dati della letteratura scientifica e applicazioni cliniche

Il test Cylex ImmunoKnow è stato testato in studi retrospettivi osservazionali (8) al fine di valutarne la correlazione con:

1. rischio di rigetto e infezioni;
2. rischio di rigetto nei pazienti sottoposti a trapianto di intestino e arruolati in protocolli di “weaning” del tacrolimus;
3. recidiva di HCV dopo trapianto di fegato, e capacità del test di predire la risposta virologica nei pazienti sottoposti a trattamento antivirale.

1- Valutazione del rischio relativo di infezioni e rigetto nei riceventi di organo solido.

I valori mediani di ATP sono risultati significativamente inferiori nei pazienti con infezioni documentate rispetto ai pazienti stabili, e significativamente più elevati in quelli con documentato rigetto.

L’analisi delle curve di rischio per rigetto e infezione ha mostrato che i pazienti mantenuti a livelli di ATP tra 130-450 ng/mL erano a minimo rischio di infezioni o rigetto; il valore di 280 ng/mL di ATP è risultato un livello target per individualizzare la terapia immunosoppressiva, definendo la più alta probabilità di mantenere la stabilità clinica con la minore quota di immunosoppressione (figura 3).

2- Rischio di rigetto nei pazienti trapiantati di intestino in protocollo di “weaning” del tacrolimus.

I pazienti con risposta immune nell’area debole-moderata avevano una migliore capacità di tollerare il “weaning” rispetto ai pazienti con risposta moderata-forte. Il test può pertanto

consentire di identificare i pazienti idonei per il “weaning”, così come il timing di riduzione/sospensione del farmaco.

3- Recidiva di HCV dopo trapianto del fegato, e capacità del test di predire la risposta virologica nei pazienti sottoposti a trattamento antivirale.

I dati relativi alla risposta immune nei pazienti immunocompetenti e trapiantati di fegato con infezione da HCV sono disponibili solo in forma di “abstract” o relazioni a congressi. I dati preliminari hanno dimostrato che i pazienti trapiantati di fegato HCV positivi erano significativamente più immunodepressi rispetto ad un gruppo paragonabile di pazienti HCV negativi, con valori medi di ATP significativamente più bassi nonostante i pazienti HCV positivi ricevessero circa la metà della terapia immunosoppressiva (figura 4).

Il test è risultato inoltre utile per l’interpretazione delle biopsie epatiche nei pazienti sottoposti a trapianto di fegato, facilitando la diagnosi differenziale tra recidiva di HCV e rigetto, diagnosi spesso difficile per la somiglianza istopatologica dei due processi. Infatti, in caso di recidiva di HCV, è stato osservato un rilascio di ATP nell’intervallo basso/moderato, mentre il rigetto è più frequentemente evidente nei pazienti con rilascio di ATP forte/moderato. Inoltre, poiché le variazioni della risposta immune determinate dal Cylex (un aumento dei livelli di ATP in caso di rigetto cellulare acuto, ed una riduzione dei livelli di ATP in caso di recidiva di HCV) precedono le modificazioni dei test di funzione epatica nei pazienti trapiantati di fegato, il test potrebbe consentire un intervento più precoce al fine di prevenire o mitigare l’evento.

Sinossi dello studio

Obiettivo principale dello studio è di valutare prospetticamente se la risposta immune determinata mediante il Cylex può predire le infezioni e il rigetto acuto nei pazienti trapiantati di fegato, e se la modulazione della terapia immunosoppressiva in accordo ai livelli di ATP può prevenire questi eventi migliorando le sopravvivenze dei pazienti e le complicanze post-operatorie.

Il progetto prevede l'esecuzione di uno studio prospettico randomizzato, in cui i pazienti trapiantati di fegato saranno randomizzati in un gruppo di controllo, in cui la terapia immunosoppressiva sarà gestita in modo convenzionale eseguendo il test Cylex senza saperne il risultato ed un gruppo di studio, in cui la terapia immunosoppressiva sarà modulata in accordo ai livelli di ATP riducendo od aumentando l'immunosoppressione.

Risultati attesi

Le infezioni sono fra le principali complicanze della terapia immunosoppressiva nel trapianto di fegato e rappresentano una delle principali cause di morbilità e mortalità dei pazienti trapiantati.

Più di 2/3 dei pazienti presentano un episodio infettivo nel primo anno dopo il trapianto e questi eventi si associano ad elevata mortalità; inoltre l'infezione può causare danno diretto o indiretto dell'organo trapiantato o favorire infezioni opportunistiche o insorgenza di neoplasie. Se i risultati dello studio confermeranno i dati preliminari pubblicati ci si attende che il test Cylex individui i pazienti a maggior rischio di episodi di infezione (livelli di ATP inferiore all'intervallo ideale) o a maggiori rischio di rigetto (livelli di ATP superiori all'intervallo ideale) adottando preventivamente in questi pazienti una modulazione della terapia immunosoppressiva che riducano il rischio di questi eventi.

Fra i risultati attesi pertanto vi è la riduzione della morbilità e mortalità per infezioni o per rigetto e una riduzione della severità della recidiva di HCV.

Pazienti e metodi

Descrizione della metodica

Il test richiede un campione di sangue intero per mantenere i linfociti alla presenza continua degli immunosoppressori durante la fase di incubazione. Il campione rimane integro per 30 ore dopo il prelievo a temperatura ambiente.

250 μ L di sangue intero anticoagulato sono diluiti, inseriti in piastre con 96 pozzetti e incubati per 15-18 ore con PHA (2.5 μ g/mL) in incubatore a 37°C e 5% di CO₂. Successivamente, le cellule T CD4⁺ sono selezionate all'interno dei pozzetti usando anticorpi monoclonali ricoperti con particelle magnetiche (Dynabeads, Dynal, Oslo Norway) ed un potente magnete (Cylex Magnet Tray 1050, Cylex Inc. Columbia, MD).

Dopo lavaggio dei linfociti CD4⁺, è aggiunto un reagente che lisa le cellule al fine di determinare rilascio dell'ATP intracellulare, ed una mistura di luciferina/luciferasi è aggiunta al lisato cellulare. Dopo 30 minuti dall'aggiunta dell'enzima, si procede a misurazione della bioluminescenza mediante un luminometro (PHL Mediators, Austria, or Berthold, Maryville, TN, USA, or Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA). Il livello di risposta immunitaria del paziente è valutato in base alla quantità di ATP prodotta espressa in nanogrammi per millilitro (figura 5).

Popolazione in studio e criteri di selezione

Lo studio prevede l'arruolamento di pazienti consecutivamente sottoposti a trapianto di fegato presso il Centro Trapianti di fegato e multi-organo, dell'Ospedale Sant'Orsola-Malpighi, dell'Università di Bologna, diretto dal prof. A.D. Pinna.

L'unico criterio di esclusione è l'infezione HIV e il mancato consenso allo studio da parte dei candidati al trapianto.

Al momento del trapianto, i pazienti saranno randomizzati in due gruppi: gruppo di controllo in cui la terapia immunosoppressiva sarà gestita in modo convenzionale senza tenere conto dei risultati del test; gruppo di studio, in cui la terapia immunosoppressiva sarà modulata in accordo ai livelli di ATP, con un target di 280 ng/mL, intervallo 130-450 ng/mL, che si è dimostrato associato a minimo rischio di rigetto e infezioni. Quando i pazienti saranno al di fuori di tale intervallo, l'immunosoppressore principale sarà aumentato o calato fino ad ottenere una riduzione od un aumento sierico del farmaco del 25% (figura 6).

Tutti i pazienti saranno sottoposti al test subito prima dell'intervento, e dopo il trapianto con la seguente cadenza: settimane 1-4 (una volta la settimana); settimane 5-8 (settimana 6 e 8); mesi 3-6 (una volta al mese); mesi 6-12 (mese 9 e 12).

I risultati del test saranno disponibili entro 24 ore dal prelievo.

Il test Cylex sarà ripetuto in caso di infezione sospetta o documentata (infezioni batteriche, micotiche, o virale, inclusa la recidiva di HCV) e rigetto, e dopo una settimana dal trattamento dell'evento.

I seguenti dati saranno registrati in un database:

- Paziente: età, sesso, razza, peso corporeo, altezza, aplotipo HLA, status CMV, diabete;
- Trapianto: indicazione, presenza di epatocarcinoma, MELD reale al trapianto, score Child al trapianto, episodi di PBS, sindrome epatorenale o emorragia digestiva nei 30 giorni precedenti il trapianto, genotipo e viremia di HCV nei pazienti HCV+, viremia e trattamento antivirale nei pazienti HBV+;
- Donatore: età, sesso, aplotipo HLA, status CMV, HCV e HBV;
- Dati intra-operatori: tempo di ischemia fredda, emorragia intraoperatoria, numero di unità di plasma e sangue trasfuse;

- Dati post-operatori: giorni di degenza in terapia intensiva e totali, giorni di nutrizione parenterale, numero di trasfusioni, complicanze chirurgiche e re-interventi, funzione renale e necessità di trattamento dialitico;
- Parametri ematochimici, inclusa la conta linfocitaria (totale e CD4+), dati microbiologici, auto-anticorpi non-organo specifici;
- Terapia immunosoppressiva: tipo, dosaggio, livelli plasmatici;
- Numero ed esito delle biopsie epatiche;
- Episodi di rigetto;
- Episodi infettivi;
- Diabete e neoplasie post-trapianto;
- Ricoveri successivi al primo per infezioni e rigetto;
- Morte e perdita del graft.

Tutti i pazienti HCV+ saranno sottoposti a biopsia epatica 6 mesi dopo il trapianto per valutare la severità di recidiva, o prima qualora sia necessario effettuare un trattamento antivirale.

I pazienti con HCV RNA positivo in PCR e recidiva di HCV istologicamente documentata, saranno sottoposti a trattamento antivirale con Interferone e Ribavirina.

Gli autoanticorpi non-organo specifici saranno determinati con lo stesso intervallo.

Risultati

I dati presentati e le analisi eseguite rappresentano valutazioni preliminari dello studio.

E' previsto un arruolamento di circa tre anni ed i risultati riportati si riferiscono al primo anno di attività. La presente valutazione interinale permette del resto di misurare la fattibilità del protocollo e di analizzare a livello preliminare l'efficacia del test Cylex.

Per eseguire questa analisi i test eseguiti nel gruppo di controllo, non noti al momento della loro esecuzione, sono stati aperti e valutati con i test dei pazienti in studio.

A causa della presenza di uno studio prospettico parallelo nel nostro Centro, i pazienti HCV positivi sono stati inclusi nell'altro protocollo in maniera esclusiva e pertanto sono presenti in minima percentuale nel presente studio.

Caratteristiche dei pazienti e del trapianto di fegato

Dal 28 maggio 2008 al 15 marzo 2009 abbiamo arruolato 30 pazienti: 11 nel gruppo A in studio e 19 nel gruppo B di controllo.

Le caratteristiche cliniche dei riceventi erano sovrapponibili tra i due gruppi e sono riportate nella tabella 1.

Le indicazioni al trapianto sono state: 12 casi epatocarcinoma (di cui 7 HBV positivi, 1 HBV-HCV positivo e 2 HCV positivi), 2 cirrosi alcolica, 1 amilodosi, 2 malattia di Caroli, 4 cirrosi HBV-relata, 2 cirrosi HCV-relata, 3 policistosi epatica, 4 altro.

L'età media dei riceventi è stata 49 ± 14 anni e l'attesa mediana per il trapianto è stata di 1.5 anni.

Tutti i trapianti sono stati eseguiti con la tecnica del "piggy-back" ed il liquido di preservazione dell'organo è stato quello di Celsior.

L'età mediana dei donatori è stata di 62 anni e l'ischemia ipotermica mediana è stata inferiore alle sei ore, senza differenze significative tra i due gruppi (tabella 1).

Complicanze dopo il trapianto e sopravvivenze dei pazienti

Complessivamente la sopravvivenza attuariale dei pazienti è stata del 87% e del "graft" del 84%. Tra 11 pazienti in studio nessuno è deceduto e ha sviluppato un rigetto d'organo, mentre nel gruppo di controllo 4 pazienti sono deceduti (21%) e nel 10% dei casi è stato diagnosticato un rigetto acuto d'organo (tabella 2).

Il risultato preliminare che più ci ha positivamente sorpreso è stata il numero inferiore di infezioni nel gruppo in studio rispetto al gruppo di controllo (9% vs. 47%, $p < 0.05$), nonostante i due gruppi avessero caratteristiche cliniche dei pazienti sovrapponibili (tabella 1).

Tra i 4 pazienti deceduti, nessuno può essere ricondotto allo studio, in quanto appartenevano al gruppo di controllo, in cui il test era eseguito mantenendo non noto il risultato. I pazienti erano tutti con elevato score di MELD e la causa principale del decesso è stata la comparsa di infezioni e di M.O.F..

Correlazioni del test Cylex con gli eventi avversi

Per testare la correttezza con cui è stato eseguito il test Cylex è stata presa in esame una popolazione di persone sane di controllo, che ha mostrato valori di ATP ng/ml = 408 ± 184 . Questo valore è risultato significativamente superiore al valore medio del test eseguito al tempo T0, prima della esecuzione del trapianto (ATP ng/mL = 149 ± 212 , $p < 0.05$).

I valori di Cylex inferiori a 130 ng/mL, limite con il quale il protocollo prevedeva un cambio di immunosoppressione al tempo T0 correlavano significativamente con lo score MELD: valore mediano di 9 vs. 23, $p < 0.05$. I pazienti in condizioni cliniche più gravi pertanto presentavano uno stato di immunodepressione superiore ai pazienti con MELD basso.

La presenza di HCC e di una cirrosi virus correlata ha mostrato la tendenza a correlare con bassi valori del test, sebbene la differenza non fosse significativa.

I valori mediani del Cylex al tempo T0 sono risultati sovrapponibili ai valori al tempo T1 dopo aver eseguito il trapianto e dopo aver iniziato una terapia immunosoppressiva (86 vs. 120, $p = n.s.$). Questo dato indica che molti pazienti presentavano uno stato di immunodepressione anche senza aver iniziato una terapia immunosoppressiva.

Il test del Cylex è risultato significativamente correlato con gli eventi infettivi come riportato nella tabella 3, mentre i dosaggi sierici di tacrolimus non erano statisticamente differenti tra i pazienti che hanno sviluppato una complicanza infettiva e quelli che non ha sviluppato tale complicanza.

I pazienti che hanno mantenuti i valori di Cylex secondo l'intervallo programmato o hanno modificato l'immunosoppressione per mantenere tale intervallo hanno ridotto in maniera significativa le percentuali di infezioni rispetto agli altri pazienti: 6% vs. 75%, $p < 0.001$.

Discussione

I risultati della presente tesi sono da valutare con cautela perché estremamente preliminari; lo studio completo prevede un arruolamento di altri due anni dopo i quali è necessario un successivo follow-up dei pazienti di almeno un anno.

Questa analisi iniziale permette del resto di acquisire un'esperienza nella gestione dei risultati del test del Cylex, che nel prosieguo dello studio renderà probabilmente più efficace il suo utilizzo.

L'analisi dei test eseguiti nel gruppo di controllo ci ha permesso di raggruppare 30 pazienti nei vari intervalli di tempo dal trapianto (T0,T1...) e ha evidenziato l'efficacia del Cylex nel correlare con l'evento infettivo.

I pazienti con episodi infettivi hanno mostrato valori di Cylex significativamente inferiori ai riceventi in condizioni cliniche stabili come riportato nella tabella 3. Queste differenze non sono state accompagnate da diversi livelli ematici di tacrolimus, principale immunosoppressore nello studio. Tale dato pertanto indica come il test sia in grado di differenziare pazienti che sono a differente rischio di sviluppare episodi infettivi, in quanto immunosoppressi in maniera differente, nonostante i dosaggi sierici di immunosoppressore fossero simili.

La possibilità di avere uno strumento che aiuti il trapiantologo a prevenire le complicanze infettive è di strategica importanza; la maggior parte degli insuccessi dopo il trapianto è riconducibile a problematiche infettive rispetto ai rigetti d'organo (9).

La correlazione del test con l'evento infettivo non implica del resto la sua efficacia nel prevenire tale evento. Sicuramente questo dato conferma che i pazienti che sviluppano la complicanza infettiva presentano un sistema immunitario più compromesso.

La misurazione dello stato di immunocompetenza dei pazienti, che dipende da più fattori (età, soggettiva risposta agli immunosoppressori utilizzati...) e la possibilità di regolare

l'immunosoppressione in base a tale valutazione e non solo in base al dosaggio sierico dell'immunosoppressore utilizzato, dovrebbe del resto permettere di ridurre al minimo indispensabile a prevenire il rigetto l'immunodepressione indotta nel paziente trapiantato.

L'altro dato preliminare rilevante riguarda i bassi valori del test per molti pazienti prima della esecuzione del trapianto e dell'inizio dei farmaci immunosoppressori.

Questo risultato suggerisce una diversa gestione dei pazienti nel post-operatorio secondo il grado di immunocompetenza registrato dal test prima del trapianto.

Pazienti con MELD score molto elevato hanno mostrato più frequentemente bassi valori di Cylex e quindi uno stato di immunodepressione, per il quale è ragionevole iniziare un'immunosoppressione diversa (farmaci diversi o dosaggi inferiori).

Il MELD è un parametro numerico che utilizzando i valori di bilirubina, creatinina e INR quantifica il grado di insufficienza epatica e correla in maniera efficace con la sopravvivenza dei pazienti in lista di attesa per il trapianto. Per tale motivo è stato utilizzato prima in U.S.A. e poi in Europa (10-11) per dare priorità ai pazienti in lista di attesa.

La correlazione del Cylex con il MELD indica pertanto che i pazienti più gravi e con una più severa insufficienza epatica sono i più immunodepressi.

Nella nostra regione dove gli organi sono allocati ai centri trapianti (università di Bologna e università di Modena) in base al MELD, diventa necessario modificare in maniera più appropriata la gestione postoperatoria dei pazienti, che secondo la loro gravità dovrebbero essere indirizzati a protocolli immunosoppressivi diversi.

Il test del Cylex permette di indirizzare la strategia immunosoppressiva in maniera più appropriata per questi pazienti, nei quali spesso le differenze di MELD score sono anche molto elevate.

Riguardo all'analisi della sopravvivenza dei pazienti, i risultati sebbene preliminari sono stati molto incoraggianti, poiché nessun paziente in studio è deceduto.

Nel gruppo di controllo invece quattro pazienti sono deceduti e la causa principale del decesso sono state le complicanze infettive non dominate dalla terapia che progressivamente hanno portato ad una M.O.F. (disfunzione di molti organi).

Questa diversa sopravvivenza a favore dei pazienti monitorizzati con il Cylex, così come la minor percentuale di complicanze infettive non è riconducibile in maniera automatica alla valutazione del test.

I pazienti in studio monitorati con il Cylex, che hanno sviluppato complicanze infettive sono stati troppo pochi per analizzare eventuali differenze del Cylex o di altri parametri clinici rispetto ai pazienti con infezioni del gruppo di controllo.

Pertanto, per dimostrare statisticamente che grazie al test siamo riusciti a gestire clinicamente meglio i pazienti prevenendo o trattando in maniera più efficace le problematiche infettive è necessario l'arruolamento di un campione di pazienti più numeroso.

Lo studio proposto del resto, a differenza dei precedenti studi pubblicati (8), si pone l'ambizioso obiettivo, non solo di valutare la correlazione tra il test e gli eventi avversi, ma prevede una differente gestione della terapia immunosoppressiva in base a tale test.

Ottimizzando l'immunosoppressione, dovrebbero ridursi le complicanze infettive (risultato confermato nell'analisi preliminare) così come il numero di rigetti o il numero di biopsie epatiche da utilizzare per la gestione dei pazienti.

La percentuale differente di sopravvivenza e di complicanze post-operatorie rilevata nell'analisi preliminare potrebbe essere secondaria a caratteristiche cliniche differenti delle due popolazioni (studio e controllo) presente nel corso della randomizzazione.

La comparazione clinica dei riceventi dei due gruppi non ha del resto riportato differenze significative di MELD score mediano nei pazienti con e senza HCC, di età mediana dei donatori, di ischemia ipotermica mediana... (tabella 1).

Le differenze di "outcome" dei due gruppi sembrerebbero pertanto non riconducibili a caratteristiche cliniche differenti dei riceventi. La natura dello studio, prospettico e

randomizzato, permetterà di ottenere popolazioni omogenee, in cui il rischio di una selezione sarà definitivamente eliminato.

In conclusione, l'analisi preliminare del presente studio mostra una buona correlazione del test di Cylex con gli eventi infettivi e il gruppo in studio, in cui il test è eseguito e reso noto, ha mostrato una bassa percentuale di complicanze infettive e nessun paziente è deceduto.

Se questi risultati saranno confermati da un campione della popolazione più numeroso, saranno presenti i presupposti scientifici per l'utilizzo di routine del test di Cylex nel follow-up dei pazienti trapiantati di fegato e la gestione clinica di questi pazienti risulterà migliorata.

Referenze

1. Post DJ, Douglas DD, Mulligan DC. Immunosuppression in liver transplantation. *Liver Transpl.* 2005; 11:1307-14.
2. O'Grady JG, Burroughs A, Hardy P, et al. Tacrolimus versus microemulsified ciclosporin in liver transplantation: the TMC randomised controlled trial. *Lancet.* 2002; 360:1119-25.
3. Starzl TE, Murase N, Abu-Elmagd K, et al. Tolerogenic immunosuppression for organ transplantation. *Lancet.* 2003; 361:1502-10.
4. Neuhaus P, Klupp J, Langrahr JM. MTOR inhibitors: an overview. *Liver Transpl* 2001; 6:473-484.
5. Berenguer M, Royuela A, Zamora J. Immunosuppression with calcineurin inhibitors with respect to the outcome of HCV recurrence after liver transplantation: results of a meta-analysis. *Liver Transpl.* 2007; 13:21-9.
6. Vivarelli M, Cucchetti A, Piscaglia F, et al. Analysis of risk factors for tumor recurrence after liver transplantation for hepatocellular carcinoma: key role of immunosuppression. *Liver Transpl.* 2005; 11:497-503.
7. United States Department of Health and Human Service. K013169; Cylex Immune Cell Function Assay, April 02, 2002.
8. Kowalski RJ, Post DR, Mannon RB, et al. Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay. *Transplantation* 2006; 82:663-668.

9. Dharnidharka VR, Stablein DM, Harmon WE. Post-transplant infections now exceed acute rejection as cause for hospitalization: a report of the NAPRTCS.
Am J Transplant 2004; 4:384.
10. Ravaioli M, Masetti M, Ridolfi L, et al. Laboratory test variability and model for end-stage liver disease score calculation: effect on liver allocation and proposal for adjustment.
Transplantation. 2007; 83:919-24.
11. Ravaioli M, Grazi GL, Ballardini G, et al. Liver transplantation with the Meld system: a prospective study from a single European center.
Am J Transplant. 2006; 6:1572-7.