

ARTICOLI ORIGINALI

Immuknow e trapianto renale a lungo termine



Cristina Andreotti¹, Michela Zortea², Alessandro Provenanzi², Maria Gentilini³, Nadia Bucella¹

(1) StS Trapianto Renale - Nefrologia e Dialisi-Ospedale S Chiara-Trento

(2) CIBIO, Centro per la Biologia Integrata, Università degli Studi di Trento, Trento

(3) Servizio Epidemiologia Clinica-APSS Trento

Corrispondenza a: Cristina Andreotti; StS Trapianto Renale, Nefrologia e Dialisi-Ospedale S. Chiara, Largo

Medaglie d'Oro, 9 - 38122 Trento.; Tel:+39 0461 903305 Fax:+39 0461 902458 Mail: cristina.andreotti@apss.tn.it

Abstract

Premessa: la sopravvivenza dei reni trapiantati è migliorata nel tempo, tuttavia è aumentata l'incidenza di patologia neoplastica. Nel follow up a distanza le neoplasie cutanee non melanoma (NMSC) sono le più frequenti e in presenza di NMSC si deve valutare se ridurre o modificare la immunosoppressione (IS). Nella pratica clinica la valutazione del livello di immunosoppressione (IS) è un problema non ancora risolto. Il kit Immuknow (Cylex) aiuta a verificare il livello di risposta immune nei pazienti trapiantati. Abbiamo valutato se pazienti trapiantati da lungo tempo e con NMSC siano più immunodepressi di pazienti senza NMSC.

Metodi: a 33 pazienti con trapianto renale da lungo tempo, 16 con NMSC e 17 senza NMSC, sono stati controllati ai tempi t0,t4,t8 e t12 la funzione renale, i livelli ematici dei farmaci e la reattività dei linfociti T CD4+, mediante il test immuknow.

Risultati: la maggior parte dei valori di reattività dei linfociti T CD4 sono risultati tra (atp) 225 e 525 ng/ml corrispondenti ad una immunosoppressione intermedia, non è stata evidenziata differenza significativa tra i due gruppi. Non è stata vista correlazione tra livelli dei farmaci e attività CD4. Sono state osservate variazioni di attività nel tempo nei singoli gruppi. 3 pazienti hanno avuto valori costantemente bassi, sotto (ATP) 225 ng/ml.

Conclusioni: Nella nostra limitata casistica di pazienti trapiantati con lungo follow up, il test Immuknow non ha mostrato differenze tra pazienti con e senza NMSC, si sono registrate variazioni della reattività dei linfociti T CD4+ nei singoli gruppi nel tempo, non è risultata correlazione con i livelli ematici degli inibitori della calcineurina (CNI). La individuazione di alcuni casi con reattività T CD4+ bassa è stata utile per la riduzione della IS.

Parole chiave: Immuknow, lungo termine, trapianto renale

Immuknow and long term kidney graft

Introduction: The survival of transplanted kidneys has improved over time, but there is an increased risk of neoplastic disease. In the long time follow up, non-melanoma skin cancers (NMSC) are the most frequent diseases and at the time of the occurrence of a NMSC we should evaluate a reduction or a change of IS. From a clinical point of view, the evaluation of immunosuppression is still a problem. The Immuknow assay may be of help in evaluating the immune response of transplanted patients. Here, by means of the ImmKnow assay, we tried to evaluate if long term renal transplant patients with NMSC are more immunosuppressed than patients without NMSC.

Methods: 33 long term kidney transplant patients, 16 with NMSC and 17 without NMSC, were recruited and blood samples were drawn at baseline, 4 months, 8 months and 12 months to check renal function, blood levels of cni and to perform immuknow assay.

Results: most values of T CD4+ reactivity were comprised between (atp) 225 and 525 ng/ml as for an moderate immunosuppression. No major differences have been observed between the two groups. No correlation with blood level of CNi was detected. T CD4+ activity changed over time for both the groups.

3 patients of the group without NMSC had levels of CD4+ reactivity constantly under (ATP) 225 ng/ml, classified as low per manufacturer's definition.

Conclusion: in our limited experience the measure of cell-mediated immunity by immuknow assay years after transplantation, has not evidenced any significant difference between patients positive for NMSC and negative patients. We observed variation of the CD4 reactivity with time, no correlation with the level of CNi and the useful identification of some cases of low levels of cell reactivity.

Key words: Immuknow, long term, renal transplantation

Introduzione

Nel corso degli anni la sopravvivenza dei reni trapiantati è aumentata sensibilmente; questo è il risultato dell'uso clinico di farmaci immunosoppressori in grado di ridurre l'incidenza del rigetto acuto all'attuale 10-20% e di ridurre la produzione di anticorpi donatore specifici (DSA) nel tempo.

Osserviamo che attualmente una delle principali cause di perdita del trapianto è la morte del paziente per patologia cardiovascolare o neoplastica. Mentre la mortalità cardiovascolare si può ridurre con una più incisiva prevenzione e terapia dei fattori di rischio, la morbilità neoplastica è più difficile da ridurre. I Registri nazionali e internazionali riportano che nella popolazione trapiantata il rischio per le neoplasie, esclusi i NMSC, è 2-3 volte maggiore che nella popolazione non trapiantata [1] (full text) [2] (full text) [3] [4]. Inoltre, si è visto che il rischio neoplastico aumenta con il tempo dal trapianto e la durata della immunosoppressione [5]. L'incidenza di neoplasie cutanee (NMSC) è molto elevata, tanto da non venir riportata in tutti i Registri; il Registro Inglese rileva un SIR (Standardized Incidence Ratio) di 16 [6]. In particolare l'incidenza dei carcinomi squamosi (SCC) è significativamente condizionata dalla durata della immunosoppressione con un'incidenza del 7% a 1 anno e del 45% a 11 anni [7] (full text) Alcuni gruppi [8] (full text) [9] hanno evidenziato come lo sviluppo di un NMSC potrebbe essere un marker di aumentato rischio di comparsa di un tumore di altro organo. Per il medico che si occupa del follow up a distanza dei pazienti trapiantati è difficile trovare un equilibrio tra protezione del trapianto e prevenzione degli effetti avversi della terapia immunosoppressiva. La comparsa di un NMSC è un evento che obbliga a valutare lo stato di immunosoppressione del paziente con l'obiettivo di una eventuale riduzione della immunosoppressione o dello switch ad altro immunosoppressore. La riduzione della terapia immunosoppressiva viene normalmente fatta in modo empirico, basandosi sui livelli plasmatici dei farmaci, dopo avere focalizzato il rischio immunologico del paziente: mismatches, rigetti acuti pregressi, presenza di anti HLA [10].

Il test Immuknow è stato approvato dalla FDA nel 2002 per misurare l'immunità cellulo mediata in soggetti in terapia immunosoppressiva. Il test misura la produzione intracellulare di ATP in linfociti T CD4+ sottoposti a stimolo mitogeno. In letteratura l'aggregazione dei dati del test di stimolazione linfocitaria con i dati clinici ha portato alla individuazione di tre livelli di reattività CD4+: reattività CD4+ bassa (ATP)<225 ng/ml, media 225-525 ng/ml, alta >525 ng/ml [11].

In questo lavoro abbiamo valutato se la misurazione della reattività CD4+ mediante il test Immuknow evidenziasse una maggiore immunosoppressione nei pazienti con NMSC.

Materiali e metodi

La casistica e i dati clinici sono stati raccolti presso l'Ambulatorio per il Trapianto Renale della Nefrologia e Dialisi dell'Ospedale di Trento, mentre l'esame immunologico è stato eseguito presso il CIBIO, il Centro di biologia integrata dell'Università degli Studi di Trento.

Per lo studio, sono stati arruolati 33 pazienti trapiantati da lungo tempo (tra i 4 e i 20 anni) dei quali 16 con pregressa diagnosi di NMSC e 17 senza diagnosi di NMSC.

Tutti hanno dato il loro assenso a partecipare firmando un modulo di consenso informato.

I pazienti dei due gruppi erano sovrapponibili per età, sesso e terapia immunosoppressiva; tutti erano in terapia con CNI, metà in ciclosporina (CsA) e metà in Tacrolimus (TAC). I pazienti inoltre erano in terapia con un antimetabolita e in parte erano in terapia con steroidi a dose minima.

Tra luglio 2012 e luglio 2013 a ciascuno dei 33 pazienti sono stati prelevati per 4 volte 2 campioni di sangue, uno per monitorare la funzione renale e i livelli ematici dei farmaci (tacrolimus e ciclosporina) e l'altro per eseguire il test Immuknow. I prelievi sono stati fatti ai tempi t0, t4, t8 e t12, cioè a distanza di 4 mesi l'uno dall'altro. I campioni sono stati raccolti al mattino e il test Immuknow è stato iniziato entro le 8 ore successive. La raccolta campioni e le misurazioni sono state fatte in cieco rispetto all'operatore. Le analisi statistiche sono state eseguite a fine studio.

Il test Immuknow è un test che si esegue incubando i campioni di sangue con fitoemoagglutinina, le cellule CD4+ vengono selezionate usando anticorpi anti CD4+ e lisate per liberare ATP, usando un luminometro si valuta la quantità di ATP prodotta.

Per quanto riguarda l'elaborazione statistica, le analisi sono state eseguite con il software SAS 9.1.3. I due gruppi di pazienti sono stati confrontati al tempo 0 per le caratteristiche demografiche e si è misurata l'eventuale differenza tra i gruppi con test t e test chi quadrato; prima di applicare il test si è effettuato il test Shapiro-Wilk sulla normalità della distribuzione. Nel caso di distribuzioni non normali si è applicato il test sui ranghi di Kruskal-Wallis. Si è analizzata anche la correlazione lineare con l'indice di Pearson della CD4 activity con i livelli di tacrolimus, di ciclosporina al primo prelievo della giornata e dopo 2 ore, durante i 4 periodi di rilevazione. I risultati sono stati considerati significativi con $p \leq 0.05$.

Successivamente i 2 gruppi di pazienti NMSC e noNMSC sono stati analizzati per verificare se la CD4+ reactivity variasse a seconda del tempo, dell'età, del genere, degli anni dal trapianto e dell'interazione tra queste variabili. Si è calcolata l'analisi della varianza a una via per misure ripetute. Si è verificata la condizione di sfericità, per cui le varianze e covarianze devono essere omogenee. Nel caso in cui il test di sfericità non sia accettato si sono usate delle correzioni per l'analisi della varianza e utilizzate le procedure proposte da Greenhouse e Gaiser (G-G) o da Huyn e Feldt (H-F) per correggere i gradi di libertà (gdl) del test F.

Risultati

I dati demografici iniziali nei due gruppi (16 pazienti positivi per NMSC e 17 negativi) non differivano significativamente tra loro, Tabella 1. Il gruppo di pazienti con NMSC era composto da 12 maschi e 4 femmine con un'età mediana di 59 anni. Il gruppo di pazienti che non ha sviluppato NMSC era composta da 12 maschi e 5 femmine, con un'età mediana di

60 anni. L'età media dei due gruppi non differisce in maniera statisticamente significativa (test $t=1.03$, $p=0.31$). Il numero mediano di anni dal trapianto per i NMSC era 13.5 e per i noNMSC 12, la differenza non è significativa (test $t=0.59$, $p=0.56$). Nel gruppo NMSC risulta che 9 pazienti hanno sviluppato un SCC (squamous cell cancer) dopo un tempo mediano dal trapianto di 3 anni; 4 pazienti hanno sviluppato un BCC (basal cell cancer) dopo una mediana di 4 anni; infine 3 soggetti hanno sviluppato entrambi (SCC+BCC) dopo un tempo mediano di 4 anni.

In Tabella 2 sono riassunti i valori medi e la deviazione standard al tempo 0 (t_0) delle quantità di farmaci assunti dai pazienti dei 2 gruppi, delle misurazioni dei livelli di concentrazione di ATP dopo stimolazione con PHA, degli indicatori di funzionalità renale, dei livelli ematici di ciclosporina e di tacrolimus e del rapporto CD4/CD8. Non vi erano differenze significative tra i 2 gruppi, tranne che per le seguenti variabili:

- La posologia mediana di ciclosporina era più bassa nel gruppo NMSC (100mg, IQR 37.5mg) rispetto al gruppo noNMSC (150mg, IQR 75 mg; test $t=2.58$, $p=0.023$), ma la posologia per kg di peso non era significativamente diversa.
- Il rapporto CD4+/CD8+ era più elevato nel gruppo NMSC (mediana 1.6, IQR 1.2) rispetto al gruppo noNMSC (mediana 1.2, IQR 0.9; test di Kruskal Wallis = 3.7, $p=0.054$), risultato al limite della significatività.

Relativamente alla misura di reattività dei linfociti T CD4+, si rileva che il gruppo NMSC aveva una concentrazione di ATP mediana pari a 321.5ng/ml (IQR 160.8 ng/ml), maggiore rispetto al gruppo noNMSC 271.5ng/ml (IQR 63.3 ng/ml; test $t=0.97$, $p=0.34$); poiché il gruppo noNMSC era al limite della normalità si è applicato il test Kruskal-Wallis che non è risultato significativo: test=1.59, con 1 gdl, $p=0.21$).

Nel periodo di osservazione i 33 pazienti arruolati sono stati sottoposti ogni 4 mesi tra luglio 2012 e luglio 2013 a verifica dei parametri della Tabella 2. La distribuzione nei vari strati della concentrazione di ATP nei linfociti T CD4 dopo stimolazione con PHA per il gruppo NMSC, per genere e durante i 4 periodi è descritta in Tabella 3, mentre i dati equivalenti per il gruppo noNMSC sono raccolti in Tabella 4.

L'analisi per verificare l'eventuale presenza di correlazione lineare tra la concentrazione di ATP nei linfociti T CD4 dopo stimolazione con PHA e i livelli di Tacrolimus, di Ciclosporina al primo prelievo del mattino e dopo 2 ore non fa emergere correlazioni lineari stabili nel tempo nei due gruppi, come riassunto nelle Tabella 5 e Tabella 6. I coefficienti di correlazione (r) risultano significativi sono in 2 periodi nei pazienti NMSC: il livello di ciclosporina ng/ml al tempo 0 risulta negativamente correlato alla concentrazione di ATP ng/ml nei linfociti T CD4 al tempo 0 ($r=-0.7$, $p=0.05$); il livello di Tacrolimus ng/ml al tempo 0 risulta

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti al tempo 0. Numerosità (N), mediana e scarto interquartile (IQR) nel gruppo non melanoma skin cancer (NMSC) e nel gruppo senza non melanoma skin cancer (No NMSC)

Variabili	NMSC			No NMSC		
	N	Mediana	IQR	N	Mediana	IQR
Età al trapianto	16	59	15	17	60	11
Anni dal trapianto	16	13.5	6	17	12	5
Anni tra trapianto e tumore della pelle a cellule squamose	9	3	1	-	-	-
Anni tra trapianto e basalioma	4	4	3.5	-	-	-
Anni tra trapianto e tumore della pelle a cellule squamose e basalioma	3	4	5	-	-	-

positivamente correlato alla concentrazione di ATP ng/ml nei linfociti T CD4 al tempo 12 ($r=+0.86$, $p=0.01$).

Tabella 2. Parametri misurati nei due gruppi di pazienti al tempo 0. Numerosità (N), mediana e scarto interquartile (IQR). Significatività dei test di confronto tra i due gruppi al tempo 0, $p \leq 0.05$

Parametri	NMSC			no NOMSC			Confronto tra i due gruppi (p)
	N	Mediana	IQR	N	Mediana	IQR	
Prednisone mg	9	5.0	1.0	5	5.0	2.5	ns
MMF1 mg	9	1000.0	0.0	13	1000.0	500.0	ns
MFA2 mg	4	630.0	270.0	0	-	-	-
CsA3 mg	8	100.0	37.5	7	150.0	75.0	0.023
CsA3 mg/kg	4	1.7	0.7	4	2.0	0.9	ns
TAC4 mg	7	1.5	2.0	9	2.5	1.5	ns
TAC4 mg/kg	7	0.0	0.0	6	0.0	0.0	ns
Livello ATP ng/ml (T CD4 reactivity)	16	321.5	160.8	17	271.5	63.3	ns
GB5	16	7050.0	3150.0	17	5300.0	1800.0	ns
Hb6 g/l	16	13.7	2.4	17	13.0	2.0	ns
Creatinina mg/dl	16	1.4	0.8	16	1.5	0.8	ns
Urea mg/ dl	16	61.0	47.5	17	58.0	36.0	ns
GFR MDRD7	16	43.5	31.5	17	52.0	36.0	ns
CrCl8 ml/ min	13	41.0	38.0	13	51.0	24.0	ns
Proteinuria mg 24 h	16	195.5	183.5	17	149.0	181.0	ns
Livello CsA3 C0 ng/ml	8	97.0	35.5	7	74.0	52.0	ns
Livello CsA3 C2 ng/ml	7	545.0	132.0	7	704.0	499.0	ns
Livello TAC4 ng/ml	8	5.0	2.1	10	6.3	4.2	ns
CD4/CD89	15	1.6	1.2	17	1.2	0.9	0.054

ns = differenza non statisticamente significativa

MMF1 = mofetil micofenolato; MFA2 = acido micofenolico; CsA3 = ciclosporina; TAC4 = tacrolimus;

Tabella 3. Distribuzione della concentrazione di ATP ng/ml nei linfociti T CD4 dopo stimolazione con PHA nei pazienti con NMSC per genere e tempo. Valori assoluti e percentuali

CD4 reactivity	Maschi (12) con NMSC N (%)				Femmine (4) con NMSC N (%)			
	tempo (mesi)				tempo (mesi)			
	0	4	8	12	0	4	8	12
<225 ng/ml	3 (25.0)	-	4 (33.3)	5 (41.7)	1 (25.0)	1 (25.0)	1 (25.0)	-
225-525 ng/ml	8 (66.7)	10 (83.3)	8 (66.7)	6 (50.0)	3 (75.0)	3 (75.0)	3 (75.0)	4 (100.0)
>526 ng/ml	1 (8.3)	2 (16.7)	-	-	-	-	-	-
non indicato	-	-	-	1 (8.3)	-	-	-	-

Dall'analisi della varianza per misure ripetute non risultano differenze significative nelle medie della concentrazione di ATP nei linfociti T CD4 dopo stimolazione con PHA nei due gruppi rilevate nei 4 periodi. Inoltre non risultano interazioni significative tra il tempo e le seguenti variabili: gruppo di pazienti, genere, anni dal trapianto, età, e tra tempo, genere e anni dal trapianto. Emerge invece una differenza significativa tra le medie della concentrazione di ATP nei linfociti T CD4 dopo stimolazione con PHA e l'interazione di tempo, genere e gruppo di pazienti.

La CD4 activity diminuisce nel corso del tempo per le donne appartenenti al gruppo noNMSC, come ben evidenziato nella rappresentazione grafica di Figura 1, mentre i maschi nello stesso gruppo mostrano una stabilità. Ai 12 mesi si rileva un andamento opposto per il gruppo NMSC, con i maschi che registrano un calo nella CD4 activity e le femmine un aumento.

Dal punto di vista clinico, 3 pazienti del gruppo senza pregressa diagnosi di NMSC hanno mostrato livelli di ATP inferiori alla media, con evidenza clinica di frequenti infezioni delle vie urinarie.

Tabella 4. Distribuzione della concentrazione di ATP ng/ml nei linfociti T CD4 dopo stimolazione con PHA nei pazienti che non hanno sviluppato NMSC (noNMSC) per genere e tempo. Valori assoluti e percentuali

CD4 reactivity	Maschi (12) noNMSC N (%)				Femmine (5) noNMSC N (%)			
	tempo (mesi)				tempo (mesi)			
	0	4	8	12	-	4	8	12
<225 ng/ml	1 (8.3)	3 (25.0)	2 (16.7)	1 (8.3)	2 (40.0)	4 (80.0)	4 (80.0)	4 (80.0)
225-525 ng/ml	11 (91.7)	9 (75.0)	7 (58.3)	10 (83.3)	3 (60.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	1 (20.0)
>526 ng/ml	-	-	2 (16.7)	-	-	-	-	-
non indicato	-	-	1 (8.3)	1 (8.3)	-	-	-	-

Tabella 5. Correlazione lineare di Pearson nei pazienti NMSC
Correlazione lineare di Pearson al tempo 0 tra la concentrazione di ATP ng/ml nei linfociti T CD4 dopo stimolazione con PHA e i livelli di Tacrolimus, Ciclosporina al primo prelievo del mattino e dopo 2 ore nei pazienti NMSC.

Pazienti NMSC	Correlazione di Pearson (r, prob p, numerosità n)	tempo (mesi)			
		0	4	8	12
Livello Tacrolimus ng/ml	r	0.23	-0.04	0.35	0.86
	p	0.58	0.92	0.39	0.01
	n	8	8	8	7
Livello Ciclosporina ng/ml tempo 0	r	-0.70	-0.62	-0.43	0.46
	p	0.05	0.19	0.40	0.36
	n	8	6	6	6
Livello Ciclosporina ng/ml dopo 2 ore	r	-0.37	0.36	-0.94	0.16
	p	0.41	0.55	0.23	0.80
	n	7	5	3	5

Discussione

Per seguire bene i pazienti trapiantati a distanza di molti anni dall'intervento è necessario somministrare la terapia immunosoppressiva appropriata a difendere il paziente dal rigetto dell'organo riducendo però il rischio di effetti avversi da immunosoppressione, in particolare il rischio neoplastico. [12] [13] (full text)

Anche nella nostra casistica 1969-2012, escludendo i NMSC, il rischio neoplastico è risultato 2.3 volte superiore a quello della popolazione non trapiantata, dove il SIR è stato calcolato dividendo il numero di casi osservati con quello atteso nella popolazione di pari età e sesso riportato nel Registro Tumori del Veneto, con una mediana di comparsa dal trapianto di 9.6 anni. Fra tutte le forme neoplastiche, le più frequenti sono quelle cutanee (NMSC).

Tabella 6. Correlazione lineare di Pearson nei pazienti noNMSC
Correlazione lineare di Pearson al tempo 0 tra la concentrazione di ATP ng/ml nei linfociti T CD4 dopo stimolazione con PHA e i livelli di Tacrolimus, Ciclosporina al primo prelievo del mattino e dopo 2 ore nei pazienti noNMSC.

Pazienti noMSC	Correlazione di Pearson (r, prob p, numerosità n)	tempo (mesi)			
		0	4	8	12
Livello Tacrolimus ng/ml	r	-0.06	-0.16	0.33	-0.02
	p	0.87	0.69	0.39	0.96
	n	10	9	9	9
Livello Ciclosporina ng/ml tempo 0	r	-0.74	-0.08	0.05	-0.23
	p	0.06	0.86	0.92	0.62
	n	7	7	7	7
Livello Ciclosporina ng/ml dopo 2 ore	r	0.28	-0.98	nc	0.58
	p	0.54	0.14	nc	0.22
	n	7	3	nc	6

nc = non calcolabile

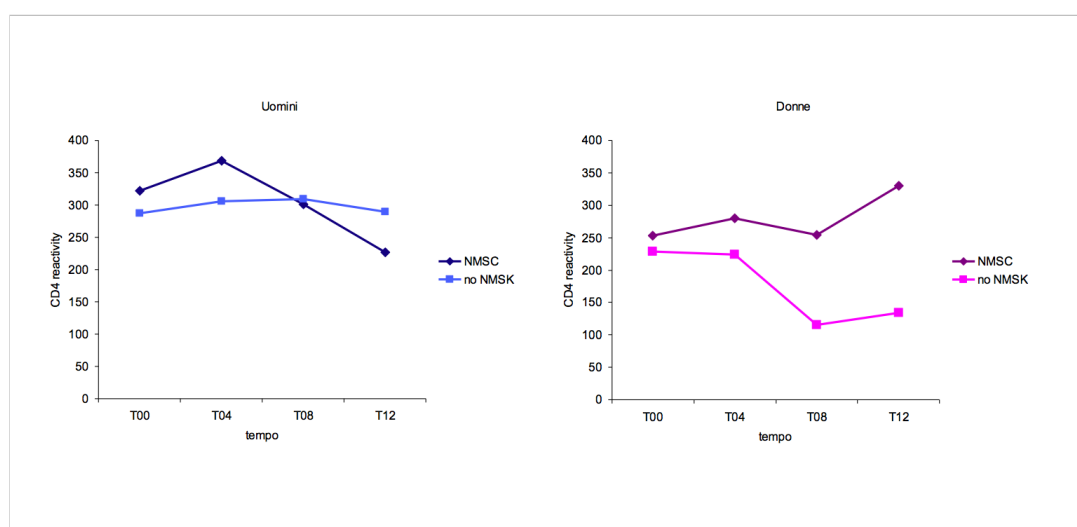


Figura 1.
Livelli medi di ATP ng/ml, espressione di CD4 reactivity, per genere e gruppi di pazienti ai vari tempi

La comparsa di un NMSC può essere utilizzata come segnale di allarme per rivedere la terapia immunosoppressiva al fine di una prevenzione secondaria [14] [15].

Rivedere la terapia immunosoppressiva con l'intento di ridurla o di modificarla richiede grande cautela: l'analisi di più di 2500 trapiantati, effettuata dal Collaborative Transplant Study, ha mostrato che la riduzione o sospensione dei CNI o del MMF dopo il primo anno dal trapianto era associata a una ridotta sopravvivenza dell'organo trapiantato [16]; inoltre, è stata segnalata una maggiore comparsa di anticorpi anti HLA donatore specifici (DSA) nei pazienti che sono stati messi in terapia con sirolimus [17]. Prima di procedere a variazioni è necessario quindi fare una stratificazione del rischio immunologico del singolo paziente, unendo dati pre trapianto e post trapianto, come il numero di rigetti acuti, la tipologia di ciascun rigetto, la funzione dell'organo, livelli dei farmaci, anti HLA de novo.

Il nostro studio è stato motivato dalla esigenza clinica di verificare se i nostri pazienti che sviluppano NMSC fossero più immunodepressi degli altri prima di procedere a variazioni della loro terapia. Abbiamo provato ad utilizzare a questo fine il test ImmuKnow, disponibile in commercio, che misura i livelli di ATP prodotti da linfociti T CD4+ dopo stimolazione con PHA. Abbiamo utilizzato il test in due gruppi di pazienti, uno con diagnosi pregressa di NMSC e uno senza diagnosi pregressa di NMSC. L'esecuzione del test si è dimostrata agevole e affidabile, anche se vincolata dalla necessità di eseguire il test il giorno stesso del prelievo.

Dalla revisione dei dati raccolti non abbiamo rilevato in generale una differenza significativa nella reattività dei linfociti T CD4+, misurata dal test ImmuKnow, tra pazienti con NMSC e pazienti esenti da NMSC. Per altro siamo consapevoli dei limiti dello studio: la bassa numerosità dei casi (33 pazienti), condizionata dal costo dei kits, e soprattutto l'utilizzo del test a distanza variabile dalla comparsa del NMSC e non al momento della prima diagnosi.

Non abbiamo osservato una correlazione tra reattività T CD4+ e livelli degli inibitori della calcineurina, sia ciclosporina che tacrolimus, come descritto da altri autori [18] [19]. Si è osservata una variazione di reattività CD4 all'interno dei singoli gruppi nel tempo, a conferma che solo misure ripetute nel singolo paziente possono essere utili per inquadrare lo stato di immunosoppressione [20].

Dal punto di vista clinico l'individuazione di 3 pazienti nel gruppo negativo per NMSC con livelli di reattività CD4 costantemente inferiori a (ATP) 225 ng/ml ha permesso di correlare il dato alle loro frequenti infezioni delle vie urinarie e di ridurre la immunosoppressione dopo lo studio.

Il test può essere utile per evidenziare pazienti iperimmunosoppressi suscettibili di infezioni nel breve [20] [21] (full text) come nel lungo periodo.

La nostra limitata e non conclusiva esperienza con il test ImmuKnow relativamente al nostro assunto, non diminuisce l'interesse per biomarcatori utili a trovare un rapporto tra i livelli dei farmaci e il livello di immunosoppressione [22] (full text) [23] [24] [20] [25] [26] (full text)

Conclusioni

Dal nostro studio pazienti con NMSC non hanno valori di reattività dei linfociti T CD4 +, misurata con il kit ImmuKnow, più bassi del gruppo controllo e in particolare nessuno di loro aveva livelli di ATP inferiori a 225 ng/ml, indice di eccessiva immunosoppressione. Nella nostra casistica non vi era in base al test utilizzato indicazione a ridurre la immunosoppressione ai pazienti con NMSC.

Inoltre nel corso dei 12 mesi di osservazione non è stata evidenziata una correlazione tra reattività T CD4+ e livelli di inibitori della calcineurina. Mentre la maggior parte dei pazienti ha avuto livelli di ATP nel range di una immunosoppressione moderata, tra 225 e 525 ng/ml, sono stati individuati 3 pazienti, nel gruppo noMSC, con livelli di ATP costantemente inferiori a 225 ng/ml possibile indice di eccessiva immunosoppressione. Si può concludere che allo stato attuale il test di stimolazione linfocitaria Immuknow può essere utile a inquadrare meglio il grado di immunosoppressione del singolo paziente prima o dopo variazioni della terapia.

Ringraziamenti

Ringraziamo le infermiere Laura Magnani, Annamaria Coser e Donatella Rossi dell'Ambulatorio Trapianto Renale per la loro cooperazione.

Bibliografia

- [1] Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson DT et al. Cancer after kidney transplantation in the United States. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2004 Jun;4(6):905-13 (full text)
- [2] Morath C, Mueller M, Goldschmidt H et al. Malignancy in renal transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2004 Jun;15(6):1582-8 (full text)
- [3] Vajdic CM, McDonald SP, McCredie MR et al. Cancer incidence before and after kidney transplantation. *JAMA* 2006 Dec 20;296(23):2823-31
- [4] Wimmer CD, Rentsch M, Crispin A et al. The janus face of immunosuppression - de novo malignancy after renal transplantation: the experience of the Transplantation Center Munich. *Kidney international* 2007 Jun;71(12):1271-8
- [5] Wimmer CD, Angele MK, Schwarz B et al. Impact of cyclosporine versus tacrolimus on the incidence of de novo malignancy following liver transplantation: a single center experience with 609 patients. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 2013 Oct;26(10):999-1006
- [6] Hofbauer GF, Bouwes Bavinck JN, Euvrard S et al. Organ transplantation and skin cancer: basic problems and new perspectives. *Experimental dermatology* 2010 Jun;19(6):473-82
- [7] Samarasinghe V, Madan V Nonmelanoma skin cancer. *Journal of cutaneous and aesthetic surgery* 2012 Jan;5(1):3-10 (full text)
- [8] Braconnier P, Del Marmol V, Broeders N et al. Combined introduction of anti-IL2 receptor antibodies, mycophenolic acid and tacrolimus: effect on malignancies after renal transplantation in a single-centre retrospective cohort study. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2012 Jun;27(6):2547-53 (full text)
- [9] Wassberg C, Thörn M, Yuen J et al. Second primary cancers in patients with squamous cell carcinoma of the skin: a population-based study in Sweden. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 1999 Feb 9;80(4):511-5
- [10] Hoshino J, Kaneku H, Everly MJ et al. Using donor-specific antibodies to monitor the need for immunosuppression. *Transplantation* 2012 Jun 15;93(11):1173-8
- [11] Kowalski R, Post D, Schneider MC et al. Immune cell function testing: an adjunct to therapeutic drug monitoring in transplant patient management. *Clinical transplantation* 2003 Apr;17(2):77-88
- [12] Suthanthiran M, Hojo M, Maluccio M et al. Post-transplantation malignancy: a cell autonomous mechanism with implications for therapy. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 2009;120:369-88
- [13] El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2009 Mar;9(3):527-35 (full text)
- [14] Bemelman FJ, de Maar EF, Press RR et al. Minimization of maintenance immunosuppression early after renal transplantation: an interim analysis. *Transplantation* 2009 Aug 15;88(3):421-8
- [15] Sánchez-Fructuoso AI, Ruiz JC, Calvo N et al. Everolimus as primary immunosuppression in kidney transplantation: experience in conversion from calcineurin inhibitors. *Transplantation* 2012 Feb 27;93(4):398-405
- [16] Barraclough KA, Staatz CE, Isbel NM et al. Review: Pharmacodynamic monitoring of immunosuppression in kidney transplantation. *Nephrology (Carlton, Vic.)* 2010 Aug;15(5):522-32
- [17] Opelz G, Döhler B Effect on kidney graft survival of reducing or discontinuing maintenance immunosuppression after the first year posttransplant. *Transplantation* 2008 Aug 15;86(3):371-6
- [18] Sampson VB, Dunn SP, Rymeski B et al. Failure of immunosuppressive drug levels to predict T-cell reactivity in pediatric transplant patients. *Journal of pediatric surgery* 2008 Jun;43(6):1134-41
- [19] Sánchez-Velasco P, Rodrigo E, Valero R et al. Intracellular ATP concentrations of CD4 cells in kidney transplant patients with and without infection. *Clinical transplantation* 2008 Jan-Feb;22(1):55-60

[20] Schulz-Juergensen S, Burdelski MM, Oellerich M et al. Intracellular ATP production in CD4+ T cells as a predictor for infection and allograft rejection in trough-level guided pediatric liver transplant recipients under calcineurin-inhibitor therapy. *Therapeutic drug monitoring* 2012 Feb;34(1):4-10

[21] Batal I, Zeevi A, Heider A et al. Measurements of global cell-mediated immunity in renal transplant recipients with BK virus reactivation. *American journal of clinical pathology* 2008 Apr;129(4):587-91 (full text)

[22] Gralla J, Huskey J, Wiseman AC et al. Trends in immune function assay (ImmuKnow; Cylex™) results in the first year post-transplant and relationship to BK virus infection. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2012 Jun;27(6):2565-70 (full text)

[23] Cravedi P, Heeger PS Immunologic monitoring in transplantation revisited. *Current opinion in organ transplantation* 2012 Feb;17(1):26-32

[24] Staats CE, Tett SE Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clinical pharmacokinetics* 2004;43(10):623-53

[25] Cravedi P, Mannon RB Noninvasive methods to assess the risk of kidney transplant rejection. *Expert review of clinical immunology* 2009 Sep 1;5(5):535-546

[26] Liefeldt L, Brakemeier S, Glander P et al. Donor-specific HLA antibodies in a cohort comparing everolimus with cyclosporine after kidney transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2012 May;12(5):1192-8 (full text)