

Quantification of BKV in urine and plasma in renal transplant recipients at PVAN (Polyomavirus-associated nephropathy) risk

Elio De Nisco¹, Pia Carmen Melillo¹, Angelo Santopietro², Maria Landi¹, Raffaele Ariola¹, Franca Romeo¹, Anna Todisco¹

¹ Unità Operativa Complessa di Virologia, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, "S.G. Moscati", Avellino

² Struttura Complessa di Chirurgia Generale e Trapianti di rene, A.O. "OO.RR. San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona", Salerno

Key Words: BKV, BKV-DNA, Real-Time PCR, PVAN

Quantificazione di BKV su urine e plasma in trapiantati di rene a rischio PVAN

SUMMARY

Background. BKV infection usually occurs in early childhood through the respiratory tract. The virus persists in a latent form in the kidney and it could be reactivated under favorable condition. The most important clinical manifestations affect kidney transplanted in which the BK polyomavirus nephropathy (PVAN) can lead to kidney failure.

Objectives. The aim of our study was to evaluate the clinical utility of quantification of BKV viruria and especially viremia detected by real-time PCR method to select the patients at risk of PVAN.

Study Design. We carried out a quantitative (dosing) assay of BKV-DNA in 24 patients transplanted in Salerno's hospital, or elsewhere, all treated with cyclosporine or tacrolimus and mycophenolate mofetil or Prednisolone. The enrollment was made on the basis of impaired renal function, in particular of the values of serum creatinine (> 25% of baseline level) and / or appearance of proteinuria. The nucleic acid extraction was performed by EXTRAgen kit (Nanogen); the extracts were submitted to quantitative evaluation by BKV Q-PCR Alert Kit indicare regione target in Real Time PCR (Nanogen) using the instrument ABI7300 (Applied Biosystems).

Results. 16 patients were negative both for viremia and viruria, 4 patients showed positive viruria but viremia < 10,000 copies / ml, 4 patients showed positive viruria and viremia > 10,000 copies / ml. In the last group, biopsy, performed to diagnose PVAN was positive and immunosuppressive therapy was reformulate leading to the decline, but never to the negativity of viral load.

Conclusions. The renal impairment combined with the quantification of BKV's viral load in urine and especially in plasma, can also be effective predictors of PVAN.

INTRODUZIONE

Il *Polyomavirus hominis* di tipo 1, conosciuto anche come virus BK (BKV) dalle iniziali del paziente dal quale è stato isolato per la prima volta nel 1971, infetta fino al 90% della popolazione. Diversi studi hanno dimostrato che più del 70% della popolazione adulta possiede anticorpi per BKV, avendo contratto, per via respiratoria, un'infezione primaria durante l'infanzia, di solito nei primi 3-4 anni di età. Negli individui immunocompetenti ciò avviene tipicamente senza particolari sintomi clinici. Dopo l'infezione iniziale il virus rimane latente sia in forma episomica che integrato nel genoma cellulare a livello del tratto urogenitale e nei linfociti B. Dopo l'infezione primaria, le cellule epiteliali dei tubuli renali e, più in generale, dell'urotelio costituiscono i siti di laten-

za e riattivazione virale (24). La patologia da BKV è rara, e per lo più conseguente ad uno stato di immunodeficienza. Il virus è stato associato a diverse patologie, tra le quali cistite emorragica, stenosi uretrali, vasculopatie e quadri di *multi-organ failure* (13). Inoltre, casi aneddotici di interessamento renale da BKV sono stati riportati in pazienti con immunodeficienze ereditarie o acquisite, ed in riceventi di trapianti d'organo diversi dal rene. Tuttavia, la nefropatia interstiziale associata all'infezione da BKV (PVAN) è emersa recentemente come causa importante di disfunzione renale dopo trapianto di rene (13, 15). Quasi tutti gli eventi clinici si verificano in condizione di immunosoppressione per la riattivazione dell'infezione latente. Le manifestazioni più importanti colpiscono i trapiantati di rene, sottoposti a

Corresponding author: Anna Todisco

U.O.C. Virologia, AORN Moscati - Contrada Amoretta (AV)

Tel./Fax: 0825 203659;

E-mail: antodisco@aosgmoscati.av.it

trattamento anti-rigetto nei quali la nefropatia da Polyomavirus BK può portare anche all'insufficienza dell'organo trapiantato (10). Dopo trapianto, secondo recenti dati di letteratura, il 30-60% dei riceventi sviluppa una viruria, il 10-20%, una viremia per BK ed il 5-10% PVAN.

La maggior parte dei casi di PVAN si presenta entro il primo anno post-trapianto; tuttavia una quota di casi viene diagnosticata in epoca successiva, tra il secondo ed il quinto anno dal trapianto (18, 19). La perdita del rene trapiantato in seguito a PVAN varia dal 10% all'80% dei casi, ma risulta più bassa nei centri che hanno attivato programmi di sorveglianza e di intervento (9, 12, 18, 22). Scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'utilità clinica della quantificazione della viruria e soprattutto della viremia di BKV rilevate con metodica Real Time PCR nel selezionare pazienti trapiantati renali a rischio di PVAN.

MATERIALI E METODI

La coorte totale di pazienti trapiantati era di 49 individui (30 maschi e 19 femmine; età media 54 anni, range 20-78). Di questi, nel periodo Giugno

2006-Marzo 2011 è stato effettuato un dosaggio quantitativo di BKV-DNA su 24 pazienti trapiantati presso la struttura ospedaliera di Salerno, o afferenti all'ambulatorio del presidio ma trapiantati in altre sedi, con regimi terapeutici immunosoppressivi [Ciclosporina (C), Tacrolimus (T), Mofetil Micofenolato (MMF), Prednisolone (S)]. L'arruolamento è stato fatto sulla base di alterazioni della funzionalità renale, in particolare dei valori di creatinina sierica (>25% del livello basale) e/o comparsa di proteinuria.

Lo *screening* per BKV-DNA è stato condotto su plasma e urine partendo dall'estrazione dell'acido nucleico che è stata eseguita con il kit Extragen (*Nanogen Advanced Diagnostic s.r.l.*), specifico per i campioni di fluidi non cellulari. L'estrazione è stata effettuata seguendo le istruzioni della ditta produttrice: la lisi del campione è stata eseguita con un agente caotropico (guanidina cloridrato), un detergente (CTAB) e un agente riducente (2-mercaptoetanolo); dopo precipitazione delle proteine e lavaggio con etanolo 70% gli acidi nucleici sono stati disciolti in acqua ultrapura. Successivamente i campioni estratti sono stati sot-

Tabella A. Pazienti con valori di viremia e viruria negativi.

Paziente	Data prelievo	Data trapianto	Creat. (mg/dl)	Viruria (copie/ml)	Viremia (copie/ml)	Biopsia (PVAN)	Terapia	Mod. Terapia
1	04/05/2007	07/03/2004	1,8	Non Ril	Non Ril	No	T+MMF+S	Nessuna
2	19/07/2007	02/07/2002	2,0	Non Ril	Non Ril	No	Ciclo+MMF+S	Nessuna
3	09/08/2007	25/05/2004	2,9	Non Ril	Non Ril	No	Ciclo+MMF+S	Nessuna
4	31/10/2007	02/08/2003	2,1	Non Ril	< 125	No	T+MMF+S	Nessuna
5	31/10/2007	02/08/2001	2,3	< 125	< 125	No	Ciclo+MMF+S	Nessuna
6	05/11/2007	05/08/2004	1,6	< 125	< 125	No	T+MMF+S	Nessuna
7	26/11/2007	01/06/1990	2,2	< 125	< 125	No	Ciclo+MMF+S	Nessuna
8	10/12/2007	30/07/2000	1,8	< 125	< 125	No	Ciclo+MMF+S	Nessuna
9	26/01/2008	29/04/2000	2,0	< 125	< 125	No	Ciclo+MMF+S	Nessuna
10	15/02/2008	15/07/1995	2,0	< 125	< 125	No	Ciclo+S	Nessuna
11	18/02/2008	03/09/1997	2,7	< 125	< 125	No	Ciclo+S	Nessuna
12	19/02/2008	23/10/2001	2,3	< 125	<125	No	T+MMF+S	Nessuna
13	07/04/2008	14/10/1985	3,0	< 125	< 125	No	T+MMF+S	Nessuna
14	07/04/2008	17/10/1998	2,5	< 125	< 125	No	T+MMF+S	Nessuna
15	08/04/2008	20/02/2005	2,2	< 125	< 125	No	T+MMF+S	Nessuna
16	09/04/2008	14/09/1999	1,8	< 125	< 125	No	Ciclo+MMF+S	Nessuna

Tabella B. Pazienti con valori di viruria positivi e viremia < 10000 copie/ml.

Paziente	Data prelievo	Data trapianto	Creat. (mg/dl)	Viruria (copie/ml)	Viremia (copie/ml)	Biopsia (PVAN)	Terapia	Mod. Terapia
17	04/03/2008	09/06/2005	1,9 a 1,7	4,1X 10 ⁵	< 125	No	T+MMF+S	Nessuna
18	04/01/2007	07/09/2002	2 a 1,3	5,8 X 10 ⁸	462	No	T+MMF+S	Rid. T
19	20/06/2007	15/01/2003	1,8 a 2,19	3,3 x10 ⁴	537	No	T+MMF+S	Nessuna
20	09/10/2007	12/03/2003	2,3 a 0,98	30 x 10 ⁶	2437	No	T+MMF+S	Rid. T

toposti a valutazione quali-quantitativa con il kit BKV Q-PCR indicare regione genomica *target* Alert Kit in Real Time PCR della ditta *Nanogen Advanced Diagnostic s.r.l.* utilizzando lo strumento ABI 7300 (*Applied Biosystems*) (8, 12, 17).

Su 4 pazienti trapiantati, la presenza di fattori predisponenti PVAN ha suggerito il ricorso all'esame biptico mediante l'identificazione in microscopia ottica di alterazioni citopatiche virus-indotte a livello delle cellule dell'epitelio tubulare renale confermata con successiva analisi immunoistochimica con anticorpi monoclonali diretti contro l'antigene *large T* di SV40.

RISULTATI

Su 24 pazienti 16 (66%, 1-16) hanno presentato valori di viremia e viruria negativi (Tabella A). Dei restanti 8, 4 pazienti (50%, 17-20) hanno evidenziato viruria positiva ma viremia <10000 copie/ml (Tabella B) e 4 pazienti (50%, 21-24) viruria positiva e viremia >10000 copie/ml (Tabella C). In quest'ultimo gruppo l'esame biptico ha dato esito positivo per PVAN ed è stata rimodulata la terapia immunosoppressiva che ha portato alla diminuzione, ma mai alla negativizzazione della carica virale.

I pazienti n.18 e n.20, entrambi con viremia alta e

viruria <10000 copie/ml, non hanno effettuato biopsia, ma hanno presentato miglioramento della funzione renale a seguito della riduzione del Tacrolimus (Tabella B).

DISCUSSIONE

Sebbene la patogenesi della PVAN non sia stata del tutto chiarita, sembra che lo sviluppo della malattia richieda l'azione sinergica di molteplici fattori di rischio, tra i quali l'immunosoppressione riveste un ruolo di preminenza (14). Poiché la presenza di replicazione virale è il fattore comune a tutti i riceventi di trapianto renale che sviluppano PVAN (4, 9, 12, 24), il monitoraggio dell'infezione da BKV è uno strumento fondamentale per identificare i pazienti a rischio (14). Lo *screening* virologico permette, infatti, di anticipare l'intervento terapeutico alle fasi precoci della malattia, con conseguente miglioramento dell'*outcome* (2, 3, 6, 7, 12, 23, 24). Inoltre, dato l'alto valore predittivo negativo, in caso di assenza di replicazione virale è possibile escludere la diagnosi di PVAN (5, 12, 20). Infine, accompagnandosi la risoluzione del quadro clinico ad una riduzione o scomparsa del virus (21), una analisi quantitativa della carica virale costituisce un utile strumento per il monitoraggio della risposta al trattamento.

Tabella C. Pazienti con valori di viruria positivi, viremia > 10000 copie/ml e biopsia positiva.

Paziente	Data prelievo	Data trapianto	Creat. mg/dl	Viruria copie/ml	Viremia copie/ml	Biopsia (PVAN)	Terapia	Mod. Terapia	Evol.
21	21/05/2007	24/02/2006	2 a 2,5	$1,6 \times 10^4$	575×10^6	SI (Giu 07)	T+MMF+S	Stop MMF	PVAN
22	25/08/2010	19/08/2009	2,44 a 2,58	$8,2 \times 10^7$	$2,2 \times 10^6$	SI (Ago 10)	T+MMF+S	Stop MMF Rid. T	PVAN
	26/09/2010			$6,1 \times 10^7$	944×10^3				
	16/11/2010			$2,4 \times 10^6$	5500				
	28/01/2011			$1,5 \times 10^5$	1555				
23	02/04/2007	13/06/2005	2,1 a 1,2	3×10^9	86×10^3	SI (Apr 07)	T+MMF+S	Rid. MMF e T	PVAN
	01/06/2007			6×10^7	4350				
	17/09/2007			$6,6 \times 10^7$	375				
	21/11/2007			$1,6 \times 10^6$	175				
	21/03/2008			62×10^6	312				
	28/10/2008			$3,9 \times 10^7$	171				
	20/05/2009			$11,5 \times 10^7$	275				
	16/11/2009			$74,7 \times 10^5$	< 125				
	10/05/2010			$10,7 \times 10^5$	< 125				
24	21/06/2007	29/10/2002	1,8 a 2,5	6×10^9	3×10^4	Si (Lug 07)	T+MMF+S	Stop MMF	PVAN
	19/09/2007			$3,6 \times 10^8$	55×10^3				
	05/12/2007			66×10^6	6075				
	09/02/2008			Non Ril	<125				
	19/02/2008			187×10^6	10100				
	30/05/2008			2×10^6	2700				
	01/08/2008			150×10^3	412				
	09/02/2009			$3,46 \times 10^3$	< 125				
	08/06/2009			25×10^3	625				
	12/03/2010			15×10^3	< 125				
	23/02/2011			71×10^3	< 125				

I test di *screening* descritti per identificare la presenza di replicazione virale a livello urinario comprendono la citologia (ricerca di *decoy cells*, ovvero cellule di sfaldamento dei tubuli renali contenenti inclusioni virali su sedimento urinario), la quantificazione del DNA virale o dell'mRNA per la proteina capsidica VP1, o la ricerca di particelle virali mediante microscopia elettronica (4, 12, 16, 24). Al fine di identificare precocemente i pazienti a rischio di PVAN, lo *screening* urinario andrebbe effettuato almeno ogni 3 mesi nel primo anno, ogni 6 mesi nel secondo anno, ed annualmente fino al quinto anno post-trapianto (14).

Il test di *screening* sulle urine è determinante per escludere la presenza di PVAN, data la sua alta sensibilità, ma la sua positività ha un valore predittivo basso, pari a circa il 20%, in quanto possono esistere quadri di replicazione virale transitoria, autolimitante (12, 19). Sono quindi necessari test aggiuntivi al fine di confermare il sospetto di PVAN e indirizzare all'esecuzione della biopsia renale, che al momento è considerata l'unico strumento idoneo a porre diagnosi di certezza (11).

La presenza di BKV-DNA nel plasma valutata mediante PCR quantitativa correla in modo significativo con la presenza di danno renale (sensibilità del 100%, predittività positiva 83%), e rappresenta, quindi, il test aggiuntivo di riferimento (12). A questo proposito, sono stati identificati valori soglia non assoluti di BKV-DNA plasmatico (≥ 10000 copie/ml) che, se persistenti, sono indicativi di una PVAN in atto (11-13), anche se un saggio unico standardizzato per monitorare la carica virale di BK è ancora al vaglio della FDA. Quando utilizzata per monitorare il corso della PVAN, la PCR quantitativa su plasma andrebbe effettuata ogni 2-4 settimane, fino alla riduzione al di sotto dei livelli soglia o, meglio, fino alla negativizzazione (11). La diagnosi di PVAN viene effettuata attraverso l'analisi della biopsia renale, con dimostrazione di alterazioni citologiche virus-indotte e la conferma della presenza di BKV mediante tecniche di immunocitochimica o ibridizzazione *in situ* (5, 20, 21).

I nostri pazienti con valori di viremia e viruria negativi o al di sotto del limite di rilevabilità erano tutti a 3 anni dal trapianto; hanno eseguito un unico rilievo della carica virale per BKV dettato dall'alterazione della funzionalità renale e non hanno eseguito biopsia (pazienti 1-16 in tabella A). Quattro pazienti hanno evidenziato viruria positiva ma viremia < 10000 copie/ml (pazienti 17-20 in tabella B); il paziente n.18, che presentava viruria di 5.8×10^8 copie/ml e viremia di 462 copie/ml era al suo terzo trapianto; il paziente n.20 che presentava viruria 30×10^6 copie/ml e

viremia di 2437 copie/ml era un doppio trapianto rene-pancreas; in nessuno dei due è stata effettuata biopsia perché ritenuto un esame troppo invasivo rispetto al quadro clinico evidenziato.

A fronte del peggioramento della funzionalità renale ma presentando una viruria alta e una viremia intermedia è stata decisa una riduzione in entrambi del Tacrolimus che ha portato al miglioramento della funzionalità renale. Sui restanti 4 pazienti la scelta di ricorrere all'esame bioptico, risultato positivo, è stata presa sulla base di criteri di natura biochimica (creatinina plasmatica alterata) come indicato nelle linee guida *Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)*, molecolare (viruria massiva e viremia > 10000 copie/ml) e clinica (stato severo di immunosoppressione) (pazienti 21-24 in tabella C) (12, 17, 24).

Il valore soglia di BKV DNA plasmatico > 10000 copie/ml indicativo di PVAN suggerito da Hirsch (11) non è universalmente accettato: un saggio unico standardizzato per monitorare la carica virale di BKV è ancora al vaglio della Food and Drug Administration (FDA) in quanto si è visto che ci sono molte variabili che entrano in gioco nella rilevazione del BKV DNA, come la scelta della matrice biologica (urine intere, sedimentate, sangue intero, plasma, siero), la progettazione dei *primers* e delle sonde nelle metodiche di RealTime Pcr e i metodi di estrazione e purificazione del DNA virale. Tutti questi elementi concorrono ad una forte variabilità che rende difficile stabilire un *cut-off* universale nel monitoraggio della viruria e viremia nella diagnosi di PVAN nel paziente trapiantato (1).

I nostri dati, tuttavia, anche se numericamente ridotti, confermano il valore soglia di BKV DNA plasmatico > 10000 copie/ml come fortemente indicativo di PVAN in atto, così come confermato da biopsia (11). Il miglioramento del quadro clinico dei pazienti n.18 e n.20 in cui è stato deciso il *tapering* del Tacrolimus, sembra confermare inoltre il valore predittivo positivo di una viruria alta e di una viremia rilevabile anche se con valori al di sotto delle 10000 copie, ai fini di un intervento terapeutico nelle fasi precoci della malattia.

BIBLIOGRAFIA

1. Bechert CJ, Schnadig VJ, Payne DA, Dong J. Monitoring of BK Viral Load in Renal Allograft Recipients by Real-Time PCR Assays. *Am J Clin Pathol* 2010; 133: 242-50.
2. Buehrig CK, Lager DJ, Stegall MD, et al. Influence of surveillance renal allograft biopsy on diagnosis and prognosis of polyomavirus-associated nephropathy. *Kidney Int* 2003; 64: 665-73.
3. Ding R, Medeiros M, Dadhania D, et al. Noninvasive diagnosis of BK virus nephritis by measurement of messenger RNA for BK virus VP1 in urine. *Transplantation* 2002; 74: 987-94.

4. Drachenberg CB, Beskow CO, Cangro CB, et al. Human polyomavirus in renal allograft biopsies: morphological findings and correlation with urine cytology. *Hum Pathol* 1999; 30: 970-7.
5. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hirsch HH, et al. Histological patterns of polyomavirus nephropathy: correlation with graft outcome and viral load. *Am J Transplantation* 2004; 4: 2082-92.
6. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Wali R, et al. Improved outcome of polyoma virus allograft nephropathy with early biopsy. *Transplant Proc* 2004; 36: 758-9.
7. Drachenberg RC, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, et al. Morphological spectrum of polyoma virus disease in renal allografts: diagnostic accuracy of urine cytology. *Am J Transplant* 2001; 1: 373-81.
8. Ginevri F, Azzi A, Botti G, Comoli P. La nefropatia associate all'infezione da polyomavirus BK dopo trapianto renale. *Giornale Italiano di Nefrologia /Anno 23 n.6.2006/pp 575-84.*
9. Ginevri F, De Santis R, Comoli P, et al. Polyomavirus BK infection in pediatric kidney-allograft recipients: a single-center analysis of incidence, risk factors, and novel therapeutic approaches. *Transplantation* 2003; 75: 1266-70.
10. Hariharan S. BK virus nephritis after renal transplantation. *Kidney Int* 2006; 69: 655-62.
11. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, et al. Polyoma virus associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analysis and recommendations. *Transplantation* 2005; 79: 1277-86.
12. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal transplant recipients. *N Engl J Med* 2002; 347: 488-96
13. Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 611-23.
14. Hirsch HH. BK virus: opportunity makes a pathogen. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 354-60.
15. Hirsch HH. Polyomavirus BK nephropathy: a (re-) emerging complication in renal transplantation. *Am J Transplant* 2002; 2: 25-30.
16. Hodur DM, Mandelbrot D. Immunosuppression and BKV Nephropathy. *N Engl J Med* 2002; 347: 2079-80.
17. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *American Journal of Transplantation* 2009; 9 (Suppl.3): S44-S58.
18. Li RM, Mannon RB, Kleiner D, et al. BK virus and SV40 coinfection in polyomavirus nephropathy. *Transplantation* 2002; 74: 497-504.
19. Nicleleit V, Hirsch HH, Binet IF, et al. Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1080-9.
20. Nicleleit V, Singh HK, Mihatsch MJ. Polyomavirus nephropathy: morphology, pathophysiology, and clinical management. *Curr Opin Nephrol. Hypertens* 2003; 12: 599-605.
21. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2003; 3: 708-14.
22. Ramos E, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, et al. Clinical course of polyoma virus nephropathy in 67 renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2145-51.
23. Randhawa P, Zygmunt D, Shapiro R, et al. Viral regulatory region sequence variations in kidney tissue obtained from patients with BK virus nephropathy. *Kidney Int.* 2003; 64: 743-7.
24. Vasudev B, Hariharan S, Hussain S, et al. BK virus nephritis: risk factors, timing, and outcome in renal transplant recipients. *Kidney Int* 2005; 68: 1834-9.