

SHORT COMMUNICATIONS/NOTE

Anticorpi non-organo-specifici e infezione da BKV in una popolazione di trapiantati renali

Cristina Costa¹, Massimiliano Bergallo¹, Giovanni Antonio Touscoz², Samuela Margio¹, Francesca Sidoti¹, Maria Elena Terlizzi¹, Chiara Merlino¹, Franca Sinesi¹, Daniela Re¹, Franca Giacchino³, Giuseppe Paolo Segoloni⁴, Rossana Cavallo¹.

¹Dipartimento di Sanità Pubblica e Microbiologia, S.C.D.U. Virologia, Università di Torino

²Lab. Fisiopatologia Epatica e Digestiva, S.C.D.U. Epatogastroenterologia, Ospedale Molinette, Torino

³S.C. Nefrologia e Dialisi, Ospedale di Ivrea

⁴Dipartimento di Medicina Interna, Unità Trapianto Rene, Ospedale Molinette, Torino

Key words: BK virus; autoantibodies; kidney transplantation.

Non-organ-specific-autoantibodies and BK virus infection in renal transplant recipients

SUMMARY

Following primary infection, the polyomavirus BK remains latent in the urinary tract e peripheral blood cells. Reactivation may occur spontaneously in healthy subjects and in immunocompromised conditions. BKV reactivation may determine urinary shedding of infected urothelial cells, hemorrhagic cystitis (particularly in bone marrow transplant recipients), and nephropathy in kidney graft recipients. Moreover, a possible role for BKV in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE) has been hypothesised. SLE is characterised by production of autoantibodies, in particular anti-double stranded (ds)-DNA antibodies. The induction of anti-dsDNA antibodies by BKV has been described in experimental animals and during naturally acquired infection in man. Therefore, it has been proposed that the BKV large T-antigen-chromatin complex may function as a hapten-carrier model with subsequent production of anti-dsDNA antibodies. Aim of this study was to evaluate the relation between BKV and autoimmunity in renal transplant recipients by determining the prevalence of non-organ-specific antibodies (NOSA) by indirect immunofluorescence on serum samples obtained from 95 renal transplant recipients during post-transplantation follow-up. BKV infection was evaluated by competitive-quantitative PCR. NOSA were present in 25/95 patients: 18 ANA and 6 SMA, one patient both ANA and SMA. BKV-DNA was positive in 16/95 patients: 3 NOSA-positive and 13 negative. BKV-DNA was negative in 79/95 patients: 22 NOSA-positive and 57 negative. The prevalence of NOSA did not differ between BKV-DNA positive and negative patients. It does not seem to exist a relation between BKV and NOSA in renal transplant recipients.

INTRODUZIONE

Il polyomavirus umano BK (BKV) è un virus ubiquitario, non rivestito, a DNA a doppia elica (double stranded-DNA, dsDNA) di 40.5-45-nm appartenente alla Famiglia delle *Papovaviridae*. Il BKV è stato isolato per la prima volta nel 1971 dalle urine di un paziente trapiantato di rene in trattamento immunosoppressivo (Gardner et al. 1971). L'infezione primaria si verifica di solito in età pediatrica, per via respiratoria e probabilmente orale, e sembra essere asintomatica o determinare una sintomatologia lieve a carico delle prime vie aeree. Dopo il superamento dell'infezione primaria, BKV resta latente nel tratto urinario e nei linfociti B periferici. Il 60-80% dei soggetti adulti risulta sieropositivo per BKV. Si può assistere ad una riattivazione dell'infezione da BKV occasionalmente in soggetti sani, in gravidanza e, soprattutto, in condizioni di immunocompromissione quali AIDS, chemioterapia, immunodeficienze congenite e nei trapiantati di organo solido

o midollo in terapia immunosoppressiva. La riattivazione può determinare eliminazione urinaria delle cellule uroepiteliali infette con viruria asintomatica, cistite emorragica (più raramente e soprattutto nei trapiantati di midollo), stenosi ureterale e/o nefrite interstiziale nei trapiantati di rene, in particolare sottoposti a terapia immunosoppressiva tripla (tacrolimus, micofenolato mofetil, corticosteroidi) (Hariharan, 2006; Major, 2001). La nefropatia associata a BKV è una causa potenziale di insuccesso del trapianto che interessa l'1-10% dei pazienti e può portare all'espianto nel 60-80% dei casi (Hirsch et al. 2005; Nিকেleit et al. 2003). D'altro canto, sono stati descritti in letteratura solo pochi casi di nefropatia in reni nativi, in particolare in bambini con immunodeficienze congenite (Rosen et al. 1983) e in soggetti con AIDS (Cubukcu-Dimopulo et al. 2000). La riattivazione di BKV può essere evidenziata monitorando la carica virale di BKV-DNA a livello sierico (viremia) e urinario (viruria), mentre la

ricerca del mRNA a livello urinario, è tuttora impiegato esclusivamente in ambito di ricerca (Ding et al 2002).

Il genoma di BKV codifica per polipeptidi funzionali e strutturali. È stato evidenziato che l'antigene large T, una proteina regolatoria codificata dalla regione precoce, è in grado di legare il dsDNA sia di origine virale sia della cellula ospite. Sulla scorta di queste osservazioni è stato proposto un meccanismo di induzione della produzione di autoanticorpi in base a cui l'espressione *in vivo* del fattore trascrizionale per il large T antigen di BKV possa indurre la formazione di anticorpi anti-dsDNA secondo un peculiare meccanismo aptene-carrier (Van Ghelue et al. 2003). L'induzione di anticorpi anti-dsDNA da parte di BKV è stata descritta in animali da esperimento inoculati con il virus e in corso di infezione primaria nell'uomo (Fredriksen et al 1993). La riattivazione dell'infezione da BKV è stata anche evidenziata in pazienti con lupus erythematosus sistemico (LES). Il LES è una patologia autoimmune ad eziologia sconosciuta caratterizzata da coinvolgimento sistemico, verosimilmente dovuto a deposito di immunocomplessi o reazione crociata nei confronti di antigeni tissutali. Il LES è caratterizzato dalla presenza di numerosi autoanticorpi circolanti (Amital and Shoenfeld, 1999; Reeves et al. 1999), diretti soprattutto contro epitopi antigenici nucleari. Tra gli anticorpi anti-nucleo (ANA), gli anticorpi anti-dsDNA sono un marcatore diagnostico di LES. In uno studio sulla riattivazione dell'infezione da BKV in soggetti con LES, è stato evidenziato che tali pazienti andavano facilmente incontro a riattivazione dell'infezione da BKV, rispetto ai soggetti normali, e che ciò era correlato alla produzione di anticorpi contro l'antigene T large (Bredholt, 1999; Rekvig et al. 1997). Peraltro nessuno studio è stato eseguito sullo sviluppo di autoanticorpi tissutali in popolazioni di soggetti prone a manifestare riattivazione dell'infezione da BKV quali i trapiantati d'organo.

Questo studio si propone di indagare la correlazione tra BKV e autoimmunità in una popolazione di trapiantati renali valutando la prevalenza di anticorpi non-organo-specifici: anticorpi anti-nucleo (ANA), anti-muscolo liscio (SMA, smooth muscle antibodies), anti-mitocondrio (AMA) e anti-microsomi di fegato e rene (LKM-1, liver kidney microsomes antibodies type 1) ricercati mediante immunofluorescenza indiretta.

MATERIALI E METODI

Sono stati esaminati 95 pazienti (64 maschi, 31 femmine; età media 54.07 anni, range 19-78) sottoposti a trapianto di rene presso l'Unità

Trapianto Rene dell'Ospedale Molinette, Torino, tra giugno 2002 e agosto 2004 (follow-up: media \pm SD, 8.5 ± 15.6 mesi; range 1-104). La patologia di base che ha portato al trapianto era rappresentata da: glomerulonefrite in 11 pazienti (glomerulonefrite cronica in 7, glomerulonefrite membranoproliferativa in 2, malattia di Berger in 2), nefropatia policistica in 6, nefropatia interstiziale in 5, sindrome di Alport in 2, sindrome emolitico uremica in 3, nefroangiosclerosi in 4, reflusso vescicoureterale o malformazioni congenite delle vie escrettrici in 4, pielonefrite cronica in 2 e insufficienza renale cronica a eziologia sconosciuta in 18. La presenza di autoanticorpi non-organo-specifici (ANA, SMA, AMA, LKM-1) è stata valutata mediante immunofluorescenza indiretta, come descritto in precedenza (Roitt and Doniach, 1972; Touscoz and Rizzetto, 2001). In breve, i sieri diluiti 1:40 in tampone fosfato (PBS) sono stati incubati per 30 minuti su sezioni crio-statiche di fegato, rene e stomaco di ratto e, per meglio definire il pattern di ANA, su cellule HEp-2 (Incstar; Diasorin, Saluggia, Italy). Dopo un lavaggio con PBS, le sezioni sono state incubate con immunoglobuline anti-Ig umane di coniglio coniugate con isotiocianato di fluoresceina (FITC, fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-human immunoglobulin; DakoCytomation, Glostrup, Denmark), diluite 1:100 in PBS. Dopo un ulteriore lavaggio con PBS, i pattern di fluorescenza sono stati esaminati mediante lettura al microscopio a fluorescenza.

L'infezione da BKV è stata valutata mediante ricerca di BKV-DNA con una metodica di PCR quantitativa-competitiva messa a punto nel nostro laboratorio, come descritto in precedenza (Merlino et al., 2005).

La differenza di prevalenza di autoanticorpi tra pazienti con e senza riattivazione dell'infezione da BKV è stata valutata mediante test del chi quadro.

RISULTATI

I risultati ottenuti sono riepilogati nella Tabella 1. Autoanticorpi non-organo-specifici erano presenti in 25 pazienti su 95 (26.3%). Un paziente era positivo sia per ANA sia per SMA; 18 pazienti erano positivi solo per ANA e 6 solo per SMA. Nessun paziente era positivo per AMA o LKM-1. Il pattern degli ANA era omogeneo in 14 pazienti (Figura I), granulare in 3 e nucleolare in 2; in nessun caso si evidenziava un pattern ANA di tipo periferico.

BKV-DNA era positivo in 16 pazienti su 95 (16.8%) con una carica virale media di 228.530 copie genomiche/ml (range 160-1600000)(Figure II e III). Di questi 16 pazienti 3 erano positivi per

autoanticorpi (di tipo ANA omogeneo) e 13 erano negativi. BKV-DNA era negativo nei restanti 79 pazienti (83.2%): 22 positivi per autoanticorpi e 57 negativi.

La differenza di prevalenza di autoanticorpi non-organo-specifici tra pazienti con riattivazione o meno dell'infezione da BKV non era statisticamente significativa ($p = n.s.$).

Tabella I. Riepilogo dei risultati ottenuti nei 95 pazienti trapiantati di rene studiati: autoanticorpi non-organo-specifici e infezione da BKV. La differenza di prevalenza di autoanticorpi non-organo-specifici tra pazienti con riattivazione o meno dell'infezione da BKV non era statisticamente significativa ($p = n.s.$).

| Pazienti (N = 95) | BKV-DNA pos. (n = 16) | BKV-DNA neg. (n = 79) |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Autoanticorpi pos. (n = 25) | 3 | 22 |
| Autoanticorpi neg. (n = 70) | 13 | 57 |

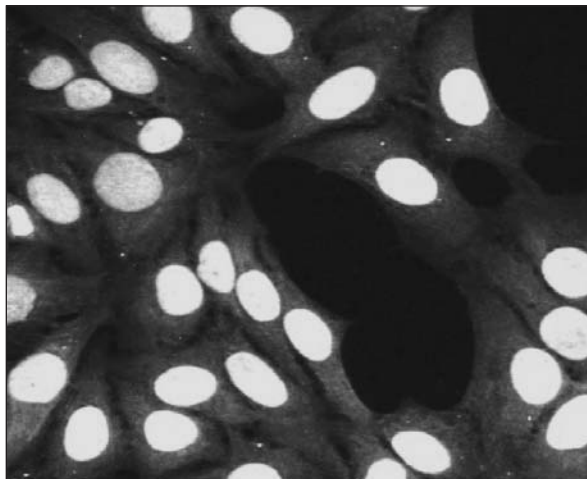


Figura I. Anticorpi anti-nucleo di tipo omogeneo su cellule HEp-2. Immunofluorescenza indiretta

DISCUSSIONE

Sebbene l'esistenza di una correlazione tra manifestazioni autoimmuni e BKV sia stata oggetto di numerosi studi sia su modelli animali sia in vivo, è difficile stabilire criteri diagnostici BKV-specifici in questo contesto. BKV potrebbe essere soltanto uno "spettatore innocente", promuovere il danno tessutale senza essere necessario per la successiva progressione (meccanismo "hit and run") oppure sostenere l'attività della malattia. L'infezione da BKV è stata implicata nella patogenesi del LES come uno dei potenziali fattori scatenanti della risposta autoimmune. La produzione di anticorpi anti-dsDNA è uno dei marcatori diagnostici di attività di malattia nel LES. In base all'induzione di autoimmunità nei confronti di DNA e nucleosomi da parte di BKV è stato ipotizzato un modello aptene-carrier secondo cui una molecola non-self, quale l'antigene T large, potrebbe dare inizio alla produzione di anticorpi anti-dsDNA e porre fine alla tolleranza dei linfociti T specifici per gli istoni tramite la presentazione congiunta dell'antigene T large e degli istoni da parte di linfociti B autologhi (Rekvig et al., 2006). Dopo l'infezione della cellula ospite, il genoma virale è rilasciato, replicato e trascritto a livello nucleare. I trascritti virali sono quindi trasportati nel citoplasma e tradotti nelle proteine virali; tra queste, l'antigene T large entra nel nucleo e si lega alla cromatina cellulare. I complessi antigene T large-cromatina possono essere rilasciati per lisi cellulare indotta dal virus oppure per distruzione delle cellule infette da parte di linfociti T CD8+. Questi complessi possono quindi essere riconosciuti da linfociti B DNA-specifici che processano e presentano peptidi derivati sia dall'antigene T large sia dagli istoni. Ciò determina quindi la trasformazione dei linfociti B in pla-

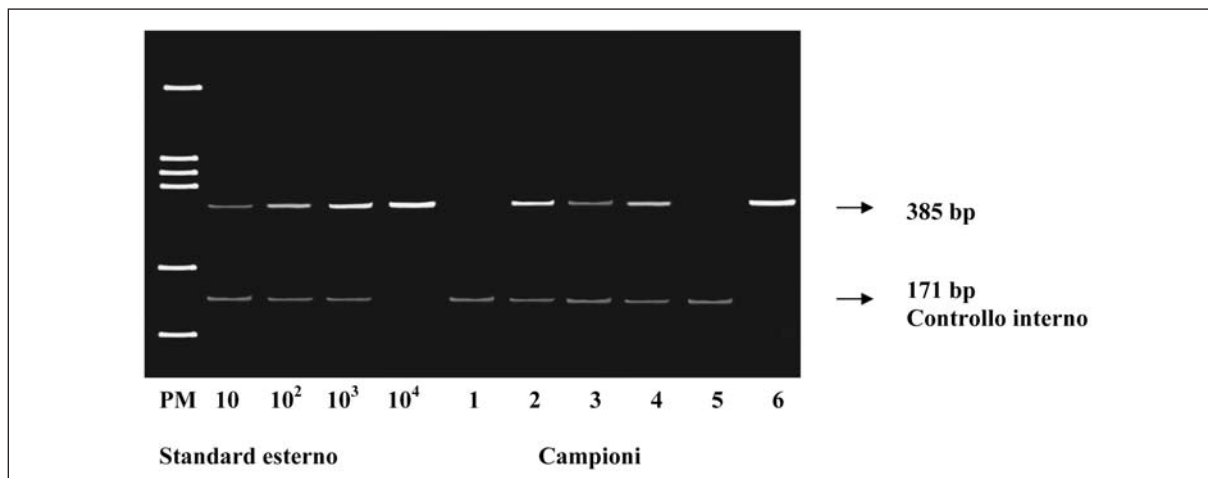


Figura II. Pattern elettroforetico di co-amplificazione di diluizioni seriate (da 10^4 a 10 copie) del plasmide pBKV e di 6 campioni in presenza del controllo interno (pEB171) nel primo round della nested PCR semi-quantitativa (Bibliografia). PM, peso molecolare; bp, paia di basi. Condizioni di amplificazione: 94°C 1 minuto, 48°C 1 minuto, 72°C 1 minuto per 32 cicli.

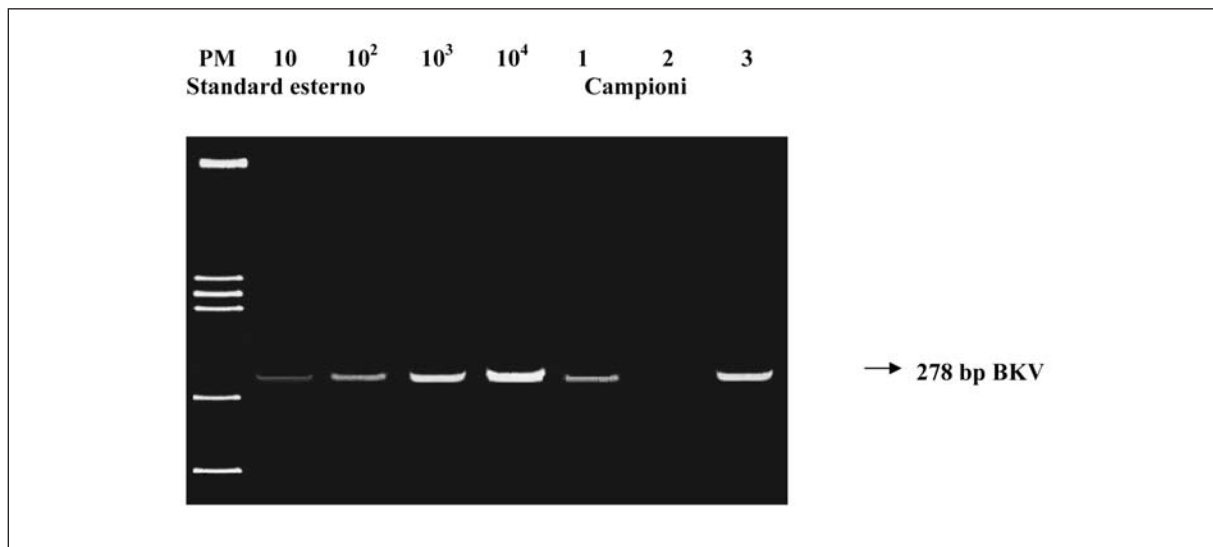


Figura III. Pattern elettroforetico della seconda amplificazione della nested PCR semiquantitativa di diluizioni 1:1000 dei prodotti di amplificazione delle quattro diluizioni dello standard esterno (pBKV) e di tre campioni positivi. PM, peso molecolare. Condizioni di amplificazione: 94°C 30 secondi, 45°C 30 secondi, 72°C 30 secondi per 10 cicli, quindi 94°C 30 secondi, 45°C 45 secondi, 72°C 1 minuto per 8 cicli.

smacellule che producono anticorpi anti-DNA, ponendo fine all'anergia dei linfociti T nei confronti degli istoni. Sebbene la presenza di anticorpi anti-DNA sia correlata a persistente eliminazione urinaria di BKV, non v'è evidenza diretta di coinvolgimento del virus nella patogenesi della nefrite lupica. Recentemente, è stato descritto il caso di una donna di 39 anni in cui la prima manifestazione di insufficienza renale acuta e LES, prima del trattamento immunosoppressivo, era rappresentata dalla nefropatia associata a polyomavirus (Barthel et al., 2002). Nessuno studio ha tuttavia indagato la possibilità che BKV induca la produzione di autoanticorpi non-organo-specifici in altri contesti ad aumentato rischio di riattivazione di BKV, quale ad esempio pazienti immunodepressi e trapiantati.

Come proposto in una review di Hirsch e Steiger (Hirsch and Steiger, 2003), a seconda del contesto clinico il ruolo patogeno dell'infezione da BKV può differire e tra i pattern di malattie associate a polyomavirus è stato identificato il pattern autoimmune, accanto a quelli citopatico, citopatico-infiammatorio, di ricostituzione della risposta immune e trasformante. Il pattern citopatico-infiammatorio è una patologia d'organo caratterizzata da replicazione virale con risposta infiammatoria limitata determinata da lisi e necrosi della cellula ospite, il prototipo è rappresentato dalla nefropatia associata a polyomavirus. Il pattern autoimmune, come descritto in precedenza, potrebbe spiegare la patogenesi di una patologia autoimmune quale il LES. Secondo questa classificazione sembrerebbe che i meccanismi patogenetici da BKV che possono entrare in gioco nel trapiantato renale non rientrino nel pattern

autoimmune e che in ogni caso l'infezione da BKV rivesta un ruolo solo nell'induzione di anticorpi di tipo ANA e non di altri autoanticorpi non-organo-specifici, tuttavia è da notare che nessuno studio in letteratura ha indagato la presenza di questi ultimi nei trapiantati renali. In base ai risultati ottenuti nel nostro studio non sembra esistere una correlazione tra riattivazione dell'infezione da BKV e presenza di autoanticorpi non-organo-specifici nei trapiantati renali, addirittura nei soggetti con infezione da BKV il numero di soggetti positivo per autoanticorpi non-organo-specifici tendeva a essere minore rispetto a quelli negativi per autoanticorpi e viceversa. Inoltre, non esisteva alcuna correlazione tra carica virale e positività per autoanticorpi, anzi la carica virale tendeva a essere maggiore nei soggetti negativi per autoanticorpi rispetto a quelli positivi (dati non mostrati). Nessuna correlazione significativa era inoltre rilevabile per quanto riguardava il tipo di anticorpo e il pattern anticorpale. Come atteso, nessun paziente era positivo per AMA o LKM-1; SMA e ANA erano rilevabili rispettivamente in 6 e 18 casi senza correlazione significativa con la positività per BKV. Analogamente non erano evidenziabili correlazioni significative considerando il pattern di ANA. ANA di tipo omogeneo sono solitamente riscontrabili in corso di LES e correlano con l'attività di malattia e con la terapia, inoltre sono presenti in altre malattie autoimmuni, connettiviti, malattie reumatiche ed epatite autoimmune di tipo 1 e in caso di infezioni batteriche e virali, deficit immunitari, neoplasie, malattie infiammatorie intestinali, disordini linfoproliferativi, nonché in soggetti sani anziani e in corso di gravidanza. ANA di tipo granulare pos-

sono evidenziarsi in caso di connettiviti, tra cui il LES; analogamente gli ANA con pattern nucleolare possono riscontrarsi in alcune connettiviti. Il pattern di tipo periferico, indicativo di presenza di anticorpi anti-dsDNA non era rilevabile in nessun paziente del nostro studio (Touscoz and Rizzetto, 2001).

Ulteriori studi su campioni pre- e post-trapianto e su una popolazione più ampia potrebbero chiarire meglio questi risultati, anche in considerazione del fatto che il riscontro di manifestazioni autoimmuni in un gruppo di pazienti immunodepressi, quali i trapiantati di rene, implica un'attenta valutazione dal punto di vista clinico e dei possibili meccanismi fisiopatologici.

BIBLIOGRAFIA

1. Amital H, Shoenfeld Y. Autoimmunity and autoimmune diseases such as Systemic lupus erythematosus. In: Systemic Lupus Erythematosus, Lahita RG Ed. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sidney, Tokio, Toronto, 1999; 1-16.
2. Barthel MF, Becker C, McCarthy ET. Interstitial nephritis due to polyomavirus in untreated systemic lupus erythematosus. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 690A.
3. Bredholt G, Olaussen E, Moens U, Rekvig OP. Linked production of antibodies to mammalian DNA and to human polyomavirus large T antigen. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 2583-92.
4. Cubukcu-Dimopulo O, Greco A, Kumar A, Karluk D, Mittal K, Jagirdar J. BK virus infection in AIDS. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 145-9.
5. Ding R, Medeiros M, Dadhania D, et al. Non-invasive diagnosis of BK virus nephritis by measurement of messenger RNA for BK virus VP1 in urine. *Transplantation* 2002; 74: 987-94.
6. Frederiksen K, Skogsholm A, Flaegstad T, Traavik T, Rekvig OP. Antibodies to dsDNA are produced during primary BK virus infection in man, indicating that anti-dsDNA antibodies may be related to virus replication *in vivo*. *Scand J Immunol* 1993; 38: 401-6.
7. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, et al. New human papovavirus (BK) isolated from urine after transplantation. *Lancet* 1971; 1: 1253-7.
8. Hariharan S. BK virus nephritis after renal transplantation. *Kidney Int* 2006; 69: 655-62.
9. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation* 2005; 79: 1277-86.
10. Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 611-23.
11. Major EO. In: Field's Virology, Fourth Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 2001; 2175-96.
12. Merlino C, Bergallo M, Daniele R, Ponzi AN, Cavallo R. BKV-DNA and JCV-DNA co-quantification assay to evaluate viral load in urine and serum. *Mol Biotechnol* 2005; 30: 1-8.
13. Nickleit V, Singh HK, Mihatsch MJ. Polyomavirus nephropathy: morphology, pathophysiology, and clinical management. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12: 599-605.
14. Reeves WH, Satoh M, Richards HB. Origins of anti-nuclear antibodies. In: Systemic Lupus Erythematosus, Lahita RG Ed. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sidney, Tokio, Toronto, 1999; 293-317.
15. Rekvig OP. Polyoma induced autoimmunity to DNA: experimental systems and clinical observations in human SLE. *Lupus* 1997; 6: 325-6.
16. Rekvig OP, Bendiksen S, Moens U. Immunity and autoimmunity induced by polyomaviruses: clinical, experimental and theoretical aspects. *Adv Exp Med Biol* 2006; 577: 117-47.
17. Roitt IM, Doniach D. Immunofluorescent test for the detection of antibodies. In: WHO booklet of immunological studies. World health Organization, Geneva, 1972; 1.
18. Rosen S, Harmon W, Krensky AM. Tubulo-interstitial nephritis associated with polyomavirus (BK type) infection. *N Engl J Med* 1983; 308: 1192-6.
19. Touscoz G, Rizzetto M. Autoimmunità per immagini. Centro Scientifico Editore, Torino, 2001.
20. Van Ghelue M, Moens U, Bendiksen S, Rekvig OP. Autoimmunity to nucleosomes related to viral infections: a focus on hapten-carrier complex formation. *J Autoimmun* 2003; 20: 171-182.

Cristina Costa

Dipartimento di Sanità Pubblica e Microbiologia, S.C.D.U. Virologia
Università degli Studi di Torino,
Via Santena 9 - 10126 TORINO
Tel.: 011 670 5630 - Fax: 011 670 5648
E-mail: cristina.costa@unito.it