

Evaluation of polyomavirus BK reactivation in lupus patients who underwent kidney transplantation

Cristina Costa¹, Giovanni Antonio Touscoz², Francesca Sidoti¹, Franca Sinesi¹, Daniela Re¹, Cinzia Balloco¹, Elsa Piasentin Alessio¹, Maria Messina³, Giuseppe Paolo Segoloni³, Rossana Cavallo¹

¹ SC Virologia U

² Laboratorio di Fisiopatologia Epatica e Digestiva

³ Unità Trapianto Rene, Azienda Ospedaliero-Universitaria San Giovanni Battista, Torino

Key words: Polyomavirus BK; lupus nephritis; kidney transplantation.

Valutazione della riattivazione del polyomavirus BK nei pazienti con nefrite lupica sottoposti a trapianto di rene

SUMMARY

Background. A pathogenic role for polyomavirus BK in systemic lupus erythematosus (SLE) has been proposed, however no study evaluated the occurrence of BK replication in renal transplant recipients according to the underlying disease leading to transplantation and its potential impact.

Methods. The occurrence of BK reactivation was serially evaluated in 468 renal transplant recipients, including 11 patients with SLE as underlying disease (overall, 2370 serum and 2370 urine specimens; 65 from SLE patients).

Results. Considering the overall occurrence of viral reactivation (viremia and/or viruria), 26/65 (40%) specimens were positive in four SLE patients (36.3%) versus 331/2143 (15.4%) in 130/227 (57.3%) non-SLE patients. A patient transplanted for class III lupus nephritis evidenced sustained BK viremia and viruria (with viremia values potentially indicative of polyomavirus-associated nephropathy) in the absence of clinical features of renal dysfunction or recurrence of lupus nephritis.

Conclusions. Further studies on larger populations and for a longer follow-up should be required to evaluate the impact of BKV reactivation in renal transplant patients with SLE as underlying disease, as well as the potential therapeutic implications.

INTRODUZIONE

Il Lupus Erythematosus Sistemico (LES) è una patologia autoimmune ad eziologia ignota che è sierologicamente caratterizzata dalla produzione di un'ampia gamma di autoanticorpi, prevalentemente diretti contro costituenti nucleari (anti-nuclear antibodies, ANA).

Tra gli ANA, gli anticorpi anti-dsDNA sono marcatori diagnostici di LES e possono contribuire all'instaurarsi della glomerulonefrite tipica del LES; in particolare, sembra che anticorpi nefritogeni riconoscano il dsDNA dei mammiferi, sebbene alcuni studi indichino che anche anticorpi specifici per i nucleosomi possono avere potenziale nefritogeno (1, 2, 10). BKV è un virus con genoma a dsDNA appartenente alla famiglia *Polyomaviridae* ed è associato allo sviluppo di nefropatia nel trapianto di rene con possibile perdita dell'organo trapiantato stesso. Il large T-antigen è una proteina regolatoria codificata dalla regione precoce del genoma di BKV ed è stato evidenziato che essa si lega al dsDNA sia virale sia della cellula ospite. È stato suggerito che il

complesso *large* T-antigen-cromatina possa agire secondo un modello aptene-carrier con conseguente produzione di anticorpi anti-cromatina, compresi anticorpi anti-dsDNA e anti-istoni (14). L'induzione di anticorpi anti-dsDNA da parte di BKV è stata descritta in animali da esperimento e durante l'infezione naturale nell'uomo (6). Nei pazienti con LES è stata evidenziata un'elevata prevalenza di BKV viruria (16%), ma senza alcuna associazione tra presenza di replicazione virale persistente e danno renale (13).

In uno studio su pazienti sottoposti a trapianto renale, abbiamo evidenziato una correlazione tra BKV e occorrenza di anticorpi anti-dsDNA, sebbene senza alcuna associazione con altre caratteristiche epidemiologiche e cliniche suggestive di nefropatia (3). A nostra conoscenza, nessuno studio ha indagato la prevalenza di riattivazione di BKV nei trapiantati di rene in cui l'indicazione al trapianto era il LES in confronto ad altre malattie di base. In questo studio, è stata valutata la prevalenza di BKV in una popolazione di trapiantati renali in accordo alla patologia di base che ha con-

Corresponding author: Cristina Costa

SC Virologia U, Azienda Ospedaliero Universitaria San Giovanni Battista di Torino

Via Santena, 9 - 10126 Torino - Tel.: 011 6705630 - Fax: 011 6705648

E-mail: cristina.costa@unito.it; costa2@molinette.piemonte.it

dotto al trapianto e il potenziale impatto sull'*outcome* clinico.

MATERIALI E METODI

Sono stati prospetticamente valutati nell'arco di un periodo di 3 anni 468 trapiantati renali (289 maschi, 179 femmine; età media \pm deviazione *standard*, 55.7 \pm 13.2 anni). Le patologie di base erano le seguenti: insufficienza renale cronica per glomerulonefrite in 83 pazienti, nefropatia policistica in 80, malattia di Berger in 46, reflusso vescicoureterale o malformazioni congenite delle vie escrettrici in 37, nefropatia vascolare in 34, nefropatia diabetica in 29, nefroangiosclerosi in 24, nefrolitiasi in 20, nefropatia interstiziale in 16, pielonefrite cronica in 12, LES in 11, sindrome emolitico-uremica in 7, nefropatia tossica in 6, sindrome di Alport in 4 e cause sconosciute o altre cause nei restanti pazienti.

I protocolli immunosoppressivi erano i seguenti: tacrolimus (FK506), steroidi (S) e micofenolato mofetil (MMF) in 212 pazienti; FK506 e S in 68; cyclosporina A (CyA), S e MMF in 42; CyA e S in 30; CyA, everolimus e S in 18; CyA e MMF in 13; CyA, azathioprina e S in 12; FK506 e MMF in 8; altri protocolli in piccoli gruppi dei restanti pazienti.

In base alla pratica del nostro centro per la valutazione della nefropatia associata a polyomavirus, la replicazione di BKV è monitorata su siero e urine due volte al mese nei primi 3 mesi, poi ogni 3 mesi fino a 1 anno *post*-trapianto, quindi ogni anno. In presenza di anomalie della funzionalità renale o in base al giudizio clinico, sono effettuati ulteriori controlli. Complessivamente, in periodo di studio, sono stati valutati 2370 campioni di siero e 2370 di urine; in particolare, tra questi, 1018 campioni combinati (da 211 pazienti) nel primo anno *post*-trapianto e 1352 a >1 anno.

Tra i pazienti con LES come patologia di base (pazienti LES), sono stati raccolti 65 campioni combinati (mediana, 5/paziente, range 2-20).

I campioni sono stati saggiati per BKV-DNA mediante un *test* quantitativo in *real-time* PCR disponibile in commercio (*target*: gene che codifica per *large T* antigen), secondo le istruzioni fornite (Q-BKV, Nanogen Advanced Diagnostics, Milano, Italia), con lo strumento 7550 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Monza, Italia), come descritto in precedenza (4).

Il riscontro di due o più campioni consecutivi positivi è stato definito come viremia o viruria persistente. In presenza di viremia, si attuava una riduzione del livello di immunosoppressione (4). L'analisi statistica è stata effettuata con un *software* commerciale (MedCalc; version 9.2.1.0).

Per la statistica descrittiva sono stati usati numeri

grezzi, percentuali, medie con deviazione *standard* e mediane. Per l'analisi statistica sono stati usati il *test* del chi quadro e il *t-test*, come appropriato. Sono stati considerati statisticamente significativi valori di $p < 0.05$.

RISULTATI

I risultati sono riepilogati nella Tabella 1. BKV viremia era presente in 20/65 (30.7%) campioni dello stesso paziente LES (0.9%) e in 97/2143 (4.5%) di 32/227 (14.1%) pazienti non-LES, senza alcuna differenza significativa di carica virale media (7500 e 7000 copie/ml, rispettivamente nei pazienti LES e non-LES).

BKV viruria era presente in 26/65 (40%) campioni di 4/11 (36.3%) pazienti LES e in 330/2143 (15.4%) di 96/227 (42.3%) pazienti non-LES, senza differenze significative di carica virale media (3321500 and 2091400, rispettivamente nei pazienti LES e non-LES).

Considerando complessivamente l'occorrenza di riattivazione virale (viremia e/o viruria), erano positive 26/65 (40%) campioni di 4 pazienti LES (36.3%) versus 331/2143 (15.4%) di 130/227 (57.3%) pazienti non-LES, con un numero significativamente più alto di episodi di riattivazione in un paziente LES ($p < 0.0001$).

Nei pazienti LES, non è stata riscontrata alcuna differenza significativa tra soggetti BKV-DNA-positivi e negativi (viremia e/o viruria) in termini di funzionalità renale valutata mediante creatinina sierica.

Il paziente LES con viremia e viruria persistenti era un uomo di 50 anni con nefrite lupica di classe III che aveva presentato riattivazione virale a 3 mesi dal trapianto con carica virale >10000 copie/ml (livello di viremia considerato come marcatore surrogato per una presunta diagnosi di nefropatia da polyomavirus [8]) persistente per 3 mesi senza sviluppo di nefropatia e successivamente ridottasi in seguito alla modulazione del protocollo immunosoppressivo con FK506, MMF e steroidi.

BK viremia e viruria persistono tuttora a 3.5 anni in assenza di nefropatia e proteinuria e con buoni livelli di creatinina.

Non si è verificata recidiva della nefrite lupica.

Il paziente aveva già presentato un episodio di BKV viremia e viruria a bassa carica (<3000 copie/ml) su due valutazioni effettuate prima del trapianto, come descritto in precedenza (3).

Erano anche disponibili dati *pre*-trapianto per un'altra paziente LES, una donna di 40 anni con nefrite ludica di classe IV che aveva presentato viruria a bassa carica (circa 1000 copie/ml) nell'unico campione valutato prima del trapianto.

DISCUSSIONE

In questo studio, è stata valutata la prevalenza di

riattivazione di BKV in un gruppo di trapiantati renali in relazione alla patologia di base che ha condotto al trapianto.

Nonostante il fatto che il Centro Trapianto Rene sia il primo in Italia per volume di attività, il numero di pazienti con nefrite lupica è basso, come attesa da un punto di vista epidemiologico; rappresentando quindi una limitazione al potere statistico dello studio.

Non abbiamo quindi rilevato alcuna differenza significativa di prevalenza di riattivazione di BKV. Ciò premesso, abbiamo descritto un paziente LES con viremia e viruria persistenti dopo il trapianto, con cariche virali sovrapponibili a quelle indicative di presunta diagnosi di nefropatia da polyomavirus, sebbene in assenza di quest'ultima o di alterata funzionalità renale o recidiva della nefrite lupica.

È stato evidenziato che i pazienti LES sono molto suscettibili a infezione persistente o riattivazione ricorrente di BKV, rispetto ai soggetti normali, e che questo dipende dalla produzione di anticorpi contro *large* T-antigen, DNA e fattori di trascrizione, ma non altri autoantigeni nonnucleosomali (12). Tuttavia, poiché dopo l'infezione primaria BKV persiste in latenza nel tratto urinario, la riattivazione può occorrere spontaneamente ed è stato evidenziato che lo *shedding* di BKV nelle urine non si riscontra solo in condizioni di immunosoppressione, ma anche negli individui sani (9). Sebbene la carica virale su urine e, soprattutto, siero possa essere usata come fattore predittivo di nefropatia nei trapiantati di rene, questo non sembra applicabile ai pazienti LES, sebbene non sia possibile trarre alcuna conclusione per il numero limitato di pazienti, anche in considerazione del fatto che non abbiamo riscontrato alcuna differenza di caratteristiche cliniche tra i pazienti LES BKV-positivi e negativi.

È stato ipotizzato che la terapia immunosoppressiva sia alla base della BKV viruria nel LES e noi abbiamo riscontrato in precedenza che il trattamento immunosoppressivo tendeva ad essere associato a positività per BKV-DNA, in contrasto con gli steroidi o l'assenza di trattamento.

In questo studio, il paziente LES con alti livelli replicativi di BKV *post*-trapianto era stato trattato prima del trapianto con methotrexate, azathioprina e steroidi, mentre il trattamento non differiva da quello degli altri pazienti LES (FK506, MMF e steroidi). Per quanto riguarda una possibile associazione tra BKV e una specifica classe di nefrite lupica, abbiamo in precedenza evidenziato nei pazienti con nefrite lupica che l'infezione da BKV era più comunemente associate a un *pattern* istopatologico di nefropatia membranosa.

Questi dati suggerirebbero un intrigante meccanismo patogenetico, simile a quello ipotizzato per altri stimoli virali noti associati a glomerulonefrite membranosa, quali virus dell'epatite B, C o dell'immunodeficienza umana (7).

Tuttavia, nel contesto trapiantologico questa osservazione non è stata confermata, in quanto il paziente LES con elevata replicazione virale era stato trapiantato per nefrite lupica di classe III e i due pazienti LES con nefrite lupica di classe V prima del trapianto non hanno evidenziato riattivazione di BKV.

Uno studio recente sulla nefrite lupica umana ha evidenziato la potenziale origine della cromatina extracellulare da cellule infette da polyomavirus nei reni umani con complessi di nucleosomi, *large* T antigen e anticorpi anti-*large* T antigen e anti-dsDNA che si legano alle membrane glomerulari e che contribuiscono all'evoluzione delle nefrite ludica nel LES (5).

Sono necessari ulteriori studi per valutare la possibilità di recidiva della nefrite lupica *post*-trapianto in relazione all'occorrenza di riattivazione di BKV al *follow-up*.

La percentuale di recidiva nei trapiantati di reni è bassa; in uno degli studi più ampi effettuati (97 pazienti consecutive con LES sottoposti a 106 trapianti di rene, recidiva in nove casi, in media 3.5 anni dopo il trapianto) (11).

L'aumento della popolazione studiata e del periodo di *follow-up* consentiranno di valutare questo, anche in relazione alla riattivazione di BKV, così come le potenziali implicazioni terapeutiche in termini di protocolli immunosoppressivi.

Tabella I. Polyomavirus BK viremia e viruria nella popolazione di trapiantati di rene a seconda della patologia di base che ha condotto al trapianto (lupus erythematosus sistemico, LES, versus altre patologie, non-LES).

	Viremia (N, %)	p	Viruria (N, %)	p
Campioni				
LES (N=65)	20* (30.7%)	< 0.0001	26 (40%)	< 0.0001
Non-LES (N=2143)	97 (4.5%)		330 (15.4%)	
Pazienti				
LES (N=11)	1 (0.9%)	n.s.	4 (36.3%)	n.s.
Non-LES (N=227)	32 (14.1%)		96 (42.3%)	

*Tutti i campioni erano dello stesso paziente trapiantato per nefrite lupica di classe III e che presentava viremia e viruria persistenti in assenza di alterazioni della funzionalità renale e recidiva del LES.

BIBLIOGRAFIA

1. Amoura Z, Piette JC, Bach JF, Koutouzov S. The key role of nucleosomes in lupus. *Arthri Rheum* 1999; 42: 833-43.
2. Cervera R, Vinas O, Ramos-Casals M, et al. Anti-chromatin antibodies in systemic lupus erythematosus: a useful marker for lupus nephropathy. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 431-4.
3. Colla L, Mesiano P, Morellini V, et al. Human polyomavirus BK in patients with lupus nephritis: clinical and histological correlations. *Lupus* 2007; 16: 881-6.
4. Costa C, Bergallo M, Astegiano S, et al. Monitoring of BK virus replication in the first year following renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 3333-6.
5. Fenton KA, Mjelle JE, Jakobsen S, Olsen R, Rekvig OP. Renal expression of polyomavirus large T antigen is associated with nephritis in human systemic lupus erythematosus. *Mol Immunol* 2008; 45: 3117-24.
6. Fredriksen 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. Guillevin L. Virus-induced systemic vasculitides. *Clin Exp Immunol* 2004; 11: 227-31.
8. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation* 2005; 79: 1277-86.
9. Kaneko T, Moriyama T, Tsubakihara Y, Horio M, Imai E. Prevalence of human polyoma virus (BK virus and JC virus) infection in patients with chronic renal disease. *Clin Exp Nephrol* 2005; 9: 132-7.
10. Kramers C, Hylkema MN, van Bruggen MC, et al. Anti-nucleosome antibodies complexed to nucleosomal antigens show anti-DNA reactivity and bind to rat glomerular basement membrane *in vivo*. *J Clin Invest* 1994; 94: 568-77.
11. Newstead CG. Recurrent disease and de novo disease. *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*, Oxford University Press, pp. 2118-2129.
12. Rekvig OP, Moens U, Sundsfjord A, et al. Experimental expression in mice and spontaneous expression in human SLE of polyomavirus T-antigen. *J Clin Invest* 1997; 99: 2045-54.
13. Sundsfjord A, Osei A, Rosenqvist H, et al. BK and JC viruses in patients with systemic lupus erythematosus: prevalent and persistent BK viruria, sequence stability of the viral regulatory regions, and nondetectable viremia. *J Infect Dis* 1999; 180: 1-9.
14. Van Ghelue M, Moens U, Bendiksen S, Rekvig OP. Autoimmunity to nucleosomes related to viral infection: a focus on hapten-carrier complex formation. *J Autoimmun* 2003; 20: 171-82.