

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Mediche Specialistiche: Progetto n°3
Scienze Nefrologiche ed Uroandrologiche

Ciclo XXIII

Settore scientifico-disciplinare di afferenza: _MED/14

**Studio prospettico sul significato clinico
e prognostico delle infezioni da virus BK
e virus JC nel trapianto di rene**

Presentata da: **Dr.ssa Giorgia Comai**

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. S. Mattioli

Prof. M.P. Scolari

Esame finale anno 2011

Sommario

Introduzione	3
Complicanze infettive post-trapianto	6
1. Fonti di esposizione e rischio epidemiologico.....	6
2. “Timeline” delle infezioni.....	9
3. Prevenzione e terapia.....	13
Polyomavirus BK	15
1. Classificazione tassonomica.....	17
2. Caratteristiche biologiche.....	28
3. L’infezione da Polyomavirus BK.....	23
La nefropatia da Polyomavirus BK	29
1. Epidemiologia.....	29
2. Fattori di rischio.....	29
3. Manifestazioni cliniche.....	31
4. Diagnosi.....	32
5. Trattamento.....	41
6. Decorso clinico e prognosi.....	46
7. La nefropatia da Polyomavirus JC.....	48
Scopo dello studio	50
1. Pazienti e metodi.....	50
2. Analisi statistica.....	56
3. Risultati.....	56

4. Discussione.....	64
Bibliografia.....	70

Introduzione

Il trapianto renale rappresenta la terapia di scelta per i pazienti con insufficienza renale cronica in fase terminale offrendo, rispetto al trattamento dialitico, innegabili vantaggi sia in termini di sopravvivenza che di qualità della vita.

Il continuo perfezionamento delle tecniche chirurgiche e l'intensa attività di ricerca, soprattutto nel campo dell'immunologia clinica, hanno fatto sì che il trapianto divenisse una realtà consolidata tra le opzioni terapeutiche per i pazienti che necessitano di un trattamento sostitutivo della funzione renale. Entro 6-12 mesi dal trapianto la riabilitazione clinica, metabolica e sociale è pressoché completa nella maggioranza dei casi.

Nel corso degli anni, soprattutto grazie al crescente numero di farmaci immunosoppressori introdotti nella pratica clinica, con conseguente riduzione degli episodi di rigetto acuto, è stato possibile aumentare notevolmente la sopravvivenza del trapianto.

Attualmente, il 95% dei trapianti è funzionante ad un anno dall'intervento e l'entità e l'incidenza delle complicanze immunologiche è progressivamente diminuita. Restano ancora da affrontare le numerose complicanze cosiddette "non immunologiche" o "mediche". Esse sono in gran parte imputabili alla stessa terapia immunosoppressiva sia per i suoi effetti diretti che per i suoi effetti collaterali. (Tabella 1)

COMPLICANZE “MEDICHE” POST-TRAPIANTO

INFETTIVE:

- **Precoci**
- **Da opportunisti**

CARDIOVASCOLARI:

- **Ipertensione arteriosa**
- **Cardiopatía ischemica**
- **Vasculopatia**

METABOLICHE:

- **Diabete**
- **Iperlipemia**

EMATOLOGICHE:

- **Leucopenia**
- **Piastrinopenia**
- **Anemia**
- **Eritrocitosi**
- **Piastrinosi**

OSSEE:

- **Necrosi asettica testa del femore**
- **Iperparatiroidismo terziario**
- **Osteoporosi**

NEOPLASTICHE:

- **Trasmessa dal donatore**
- **Recidive**
- **De novo**

RENALI:

- **Recidiva della nefropatia di base**
- **Nefropatia cronica da trapianto**

TABELLA 1. Complicanze mediche nel paziente sottoposto a trapianto renale

Tali patologie, possono compromettere sia la funzionalità e la sopravvivenza del trapianto a lungo termine ma anche e soprattutto le condizioni cliniche del paziente nel suo complesso.

Ancora oggi, purtroppo, si assiste alla morte del paziente trapiantato con rene funzionante. Le tre principali cause, in ordine di importanza sono:

- 1) patologia cardiovascolare
- 2) patologia neoplastica

3) infezioni

Se la patologia cardiovascolare è da considerare una conseguenza inevitabile dell'IRC, l'aumentata incidenza di neoplasie nei pazienti sottoposti a trapianto e la maggiore suscettibilità di questi ultimi alle infezioni sono da attribuirsi alla terapia immunosoppressiva.

L'incidenza di patologie neoplastiche sta drammaticamente aumentando, probabilmente in relazione al prolungamento della vita media del graft e del paziente e all'innalzamento dell'età media dei riceventi negli ultimi anni.

Per quanto riguarda le patologie infettive invece, la possibilità di disporre di strumenti diagnostici sempre più accurati e di terapie antimicrobiche efficaci, ha permesso di ridurre l'incidenza e la severità di queste complicanze.

Ciononostante, il problema della suscettibilità alle infezioni nel paziente trapiantato rimane comunque in primo piano, soprattutto per l'affacciarsi di nuove e ancora poco conosciute infezioni quali, ad esempio, quella da Polyomavirus.

Complicanze infettive post-trapianto

Un vastissimo gruppo di patogeni può essere causa, per i pazienti sottoposti a trapianto renale, di numerose sindromi infettive, alcune delle quali molto pericolose sia in termini di sopravvivenza del graft che di sopravvivenza del paziente stesso. Il tasso di infezioni nel primo anno post trapianto va dal 48 % al 69%. (1)

La complessità dell'intervento chirurgico, unitamente allo stato di immunosoppressione indotto dalla terapia antirigetto, rendono ragione dell'elevato rischio infettivo a cui il paziente trapiantato è esposto.

1. Fonti di esposizione e rischio epidemiologico

Nei pazienti sottoposti a trapianto d'organo, le manifestazioni cliniche di un' infezione possono talvolta essere assenti o molto aspecifiche.

D'altra parte, un quadro clinico-laboratoristico suggestivo di un processo infettivo in atto (rialzo della temperatura, alterazioni dell'esame emocromocitometrico, sintomi gastrointestinali, alterazioni neurologiche, etc...) deve essere attentamente interpretato dal momento che potrebbe essere secondario non solo ad un'infezione ma anche ad un rigetto acuto o ad una reazione avversa ai farmaci immunosoppressori.

Per questo motivo, in caso di sospetta infezione, un'attenta valutazione delle caratteristiche e della storia clinica del paziente è fondamentale per guidare il medico verso gli esami clinici e strumentali più appropriati per confermare la diagnosi.

Il primo fattore da considerare è sicuramente lo stato di immunosoppressione del paziente, valutando sia il tipo di farmaci utilizzati ma anche il loro dosaggio e la durata del trattamento.

In secondo luogo è necessario analizzare la storia clinica del paziente al fine di indagare su una possibile esposizione ad un agente infettivo pre e/o post-trapianto. Relativamente a quest'ultimo punto, per facilitare l'orientamento diagnostico, le fonti di infezione possono essere schematicamente suddivise in quattro gruppi (Tabella 1).

1. Infezioni derivate dal donatore

Si tratta molto frequentemente di infezioni virali latenti (CMV, EBV) che possono riattivarsi nel paziente trapiantato, soprattutto se sieronegativo e ricevente un organo da donatore sieropositivo. Talvolta, infezioni attive nel donatore possono non essere riconosciute al momento del prelievo dell'organo. I patogeni più frequentemente isolati in questi casi sono *Staphylococcus*, *Streptococcus Pneumoniae*, *Candida spp*, *Salmonella spp*, *E.Coli* i quali possono causare infezioni sistemiche o infettare i tessuti devitalizzati e le sedi anastomotiche producendo ascessi o aneurismi micotici. (2)

Appartengono a questa categoria anche alcuni virus causa di infezione attiva nel donatore e non identificati al momento dello screening pre-trapianto come il West Nile virus, il virus della coriomeningite umana, i rabdovirus, HHV-6-7-8, HSV, HBV, HCV e HIV. (3)

2. Infezioni derivate dall'esposizione del ricevente

In questa categoria sono comprese le infezioni contratte dal ricevente nel periodo precedente al trapianto e rimaste successivamente latenti, controllate dalle specifiche risposte immunitarie cellulari e umorali (Mycobatteri, Strongiloides Stercoralis, virus come VZV, HBV, HCV, HIV, Histoplasma Capsulatum e Coccidioides Immitis).

Lo stato di immunosoppressione, indotto dalla terapia antirigetto, aumenta notevolmente il tasso di riattivazione di infezioni croniche favorendone la progressione.

3. Esposizione in comunità

Contatti con individui infetti (in famiglia o sul luogo di lavoro), viaggi in particolari zone geografiche, cibo o acqua contaminati, sono fattori di rischio per un paziente immunodepresso.

Infezioni causate dai comuni virus respiratori (virus influenzali e parainfluenzali, RSV, Adenovirus) o da patogeni solitamente atipici per gli adulti (infezione primaria da VZV) sono tra le cause principali di focolai broncopneumonici, spesso complicati da sovrainfezioni fungine.

Infezioni sistemiche o disseminate possono risultare dall'esposizione a diversi patogeni quali ad esempio Mycobacterium Tuberculosis o Salmonella spp.

Infezioni primarie da EBV o CMV possono essere secondarie a trasfusione di sangue e derivati.

Più raramente e contestualmente a soggiorni in particolari aree geografiche, può manifestarsi il rischio di micosi sistemiche

(Blastomyces Dermatitidids, Coccidioides Immitis e Histoplasma Capsulatum).

Questi sono solo alcuni esempi, dal momento che il gruppo di patogeni potenzialmente causa di un' infezione acquisita in comunità è davvero molto vasto e i fattori di rischio dipendono dallo stile di vita e dalle abitudini del singolo paziente.

4. Esposizione nosocomiale

Le infezioni nosocomiali, spesso ad opera di microrganismi multiresistenti (Enterococchi vancomicina-resistenti, Stafilococchi meticillino-resistenti, Candida o Aspergillo fluconazolo-resistenti) sono tipiche del primo periodo post trapianto.

I fattori di rischio e lo spettro di patogeni potenzialmente responsabili sono gli stessi individuati per tutti i pazienti ospedalizzati e sottoposti ad un intervento di chirurgia maggiore.(2, 4)

2. "Timeline" delle infezioni

Confrontarsi con il lungo elenco di patogeni potenzialmente causa di infezione nel paziente trapiantato significa non solo considerare il rischio epidemiologico relativo alle possibili fonti di infezione ma anche correlarlo alla storia clinica del paziente e ai principali eventi clinici che caratterizzano il decorso del trapianto e che sono comuni a tutti i pazienti.

Fishman J.A. suggerisce che, tracciando idealmente una linea temporale a partire dal momento del trapianto fino al termine del primo anno, sia possibile individuare tre periodi di tempo, ciascuno caratterizzato da specifici fattori di rischio e, conseguentemente, da complicanze infettive ad opera di un ben definito gruppo di patogeni (Figura 1). (2, 4)

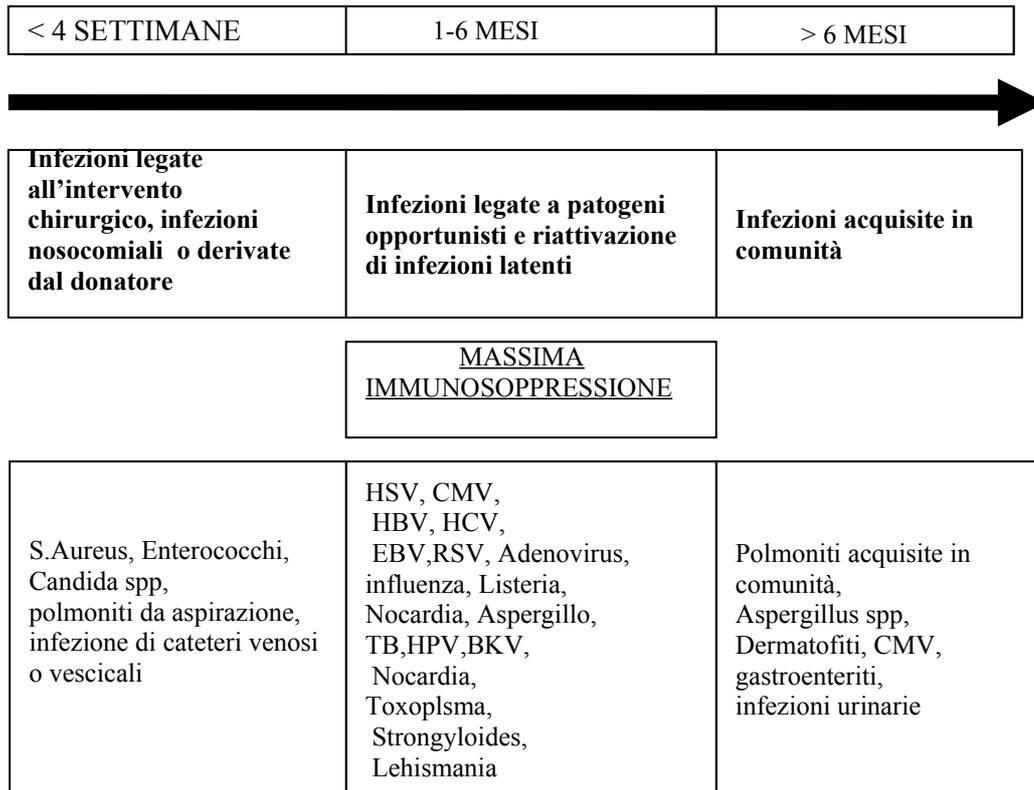


FIGURA 1. "Timeline" delle infezioni post-trapianto renale.

1) PRIME 4 SETTIMANE POST-TRAPIANTO

Nell'immediato periodo post-trapianto, le infezioni da parte di patogeni opportunisti sono rare ed il rischio infettivo è soprattutto correlato all'intervento chirurgico e all'ospedalizzazione (colonizzazione di cateteri venosi o drenaggi vascolari da parte di microrganismi multiresistenti, polmoniti da aspirazione, infezioni della ferita chirurgica, infezioni urinarie secondarie al posizionamento di catetere vescicale, infezioni da Clostridium difficile a seguito di una prolungata terapia antibiotica).

Anche le infezioni derivate dal donatore possono presentarsi molto precocemente, talora con quadri clinici particolarmente severi.

2) DA 1 A 6 MESI POST-TRAPIANTO

I primi mesi post-trapianto sono caratterizzati da un'intensa immunosoppressione che si traduce in una maggiore suscettibilità alle infezioni da opportunisti e alle infezioni virali. Queste ultime possono essere infezioni derivate dal donatore, infezioni croniche del ricevente riattivate o infezioni acquisite in comunità.

Le infezioni virali non provocano solo un danno tessutale e cellulare diretto ma possono rendersi pericolose per il paziente trapiantato per i loro effetti cosiddetti "indiretti":

- Induzione di una risposta infiammatoria con conseguente produzione e rilascio di citochine, interleuchine e fattori di crescita. Tali effettori, aventi attività immunomodultrice, aumentano il livello di immunosoppressione del paziente e, con esso, il rischio di infezioni opportunistiche.
- Alterazione dell'espressione degli antigeni di superficie sulle cellule del trapianto, con conseguente aumento del rischio di rigetto. Antigeni condivisi dal virus e dal trapianto possono divenire epitopi bersaglio di cellule T cross-reattive. Questo mimetismo molecolare, a cui consegue un certo grado di immunità eterologa, può rendere difficile lo sviluppo di una tolleranza verso il trapianto.
- Cross-talking tra specie virali coesistenti nello stesso individuo. Tale meccanismo consente ai virus di potenziare l'uno l'attività replicativa dell'altro, a danno del paziente.

Una complicanza particolarmente temibile nei primi mesi post-trapianto è la sindrome "emofagocitica". Si tratta di una patologia caratterizzata dalla contemporanea presenza di epatosplenomegalia, disfunzione epatica, pancitopenia e ipofibrinemia. Si manifesta precocemente nello 0,4% dei pazienti trapiantati, spesso in

associazione con infezioni virali quali EBV, CMV,HSV, VZV, HIV, HHV8, e Parvovirus (Tabella 2). (3)

J

Patogeni virali nei pazienti con trapianto renale

<i>Herpes simplex</i>	HBV
<i>Varicella zooster</i>	Papilloma
<i>EBV</i>	Polyoma BK
<i>CMV</i>	Polyoma JC
<i>HHV6</i>	Adenovirus
<i>HHV7</i>	RSV
<i>HHV8/KSHV</i>	Influenza
<i>Parvovirus B 19</i>	Parainfluenza
<i>West Nile virus</i>	Metapneumovirus
<i>Rabdovirus</i>	HIV
<i>HCV</i>	SARS (Coronavirus)

TABELLA 2. Principali infezioni virali nei pazienti sottoposti a trapianto di rene.

OLTRE 6 MESI POST –TRAPIANTO:

L’incidenza delle complicanze infettive si riduce dopo il primo anno post-trapianto ed il rischio infettivo è solo di poco superiore a quello dei pazienti immunocompetenti.

Tipiche di questo periodo sono invece le complicanze derivate dalle infezioni croniche contratte dal paziente prima del trapianto o nel periodo immediatamente successivo. Si tratta, nella maggioranza dei casi, di infezioni virali da cui possono derivare patologie che mettono a rischio sia la sopravvivenza a lungo termine del trapianto (rigetto cronico da CMV, nefropatia da BKV), che la sopravvivenza del paziente stesso (cirrosi HCV-relata, patologie linfoproliferative da EBV, tumori della pelle o anogenitali HPV-relati).(3)

3. Prevenzione e terapia

3.1 Valutazione del ricevente

La valutazione dello stato vaccinale del ricevente (tetano, HBV, vaccini dell'infanzia, influenza, pneumococco) è il primo tra i provvedimenti volti a ridurre al minimo le complicanze infettive. Successivamente al trapianto è possibile aggiornare o integrare la copertura vaccinale.

Vaccini con virus vivi attenuati sono comunque da evitare, almeno nel primo anno post-trapianto.(3)

Patologie infettive acute o croniche nel ricevente non necessariamente controindicano il trapianto purchè sia stata verificata la possibilità di un trattamento adeguato per eradicarle o controllarle dopo l'intervento.(2)

3.2 Valutazione del donatore

Lo screening sul donatore, al momento del prelievo degli organi, prevede l'esecuzione di test sierologici e colturali per identificare i patogeni più comuni. Tali indagini non sono però sensibili al 100% e sono in parte condizionate dal limitato tempo a disposizione al momento del prelievo. In alcuni casi, un' infezione attiva può non essere riconosciuta nel donatore perchè ancora non è avvenuta la sier conversione. Per questo motivo, essendo il trapianto renale considerato un intervento chirurgico d'elezione, non vengono trapiantati organi provenienti da donatori nei quali non è stato possibile escludere la presenza di un processo infettivo in atto e che presentavano, al momento del decesso, febbre o altri sintomi riferibili ad una patologia infettiva.

Dobbiamo comunque precisare che non sempre la presenza di un'infezione nel donatore controindica il trapianto: organi di pazienti con alcune specifiche infezioni possono essere considerati per specifici riceventi dopo appropriato consenso informato.

Se la necessità di trapianto è particolarmente urgente è possibile trapiantare organi di donatori HBV positivi con anticorpi diretti contro HBcAg (in assenza di anticorpi anti HBsAg) in pazienti vaccinati o con anamnesi positiva per infezione acuta da HBV. Gli organi provenienti da donatori HCV positivi sono riservati a riceventi HCV positivi.

3.3 Profilassi

Un'adeguata assistenza del paziente, generalmente ricoverato in una unità di terapia intensiva, unitamente alla profilassi antibiotica prevista per un intervento chirurgico, consentono di controllare l'incidenza di infezioni nosocomiali.

Dopo la dimissione, molti centri consigliano una terapia antibiotica di profilassi per i primi mesi post-trapianto. Il farmaco più spesso utilizzato è il cotrimoxazolo, molto efficace nel ridurre il rischio di infezioni urinarie, respiratorie e da patogeni opportunisti (*Pneumocystis Carini*, *L. monocytogenes*, *Toxoplasma*, *Nocardia*).

In caso di infezioni ricorrenti, la profilassi può essere prolungata a tempo indeterminato. Si tratta tuttavia di un provvedimento non universalmente condiviso, dal momento che la terapia antibiotica prolungata aumenta la possibilità di indurre resistenze e il rischio di sviluppare reazioni avverse. La profilassi per l'infezione da CMV può essere somministrata a pazienti sieronegativi che hanno ricevuto un organo da un donatore sieropositivo.

La decisione di non iniziare una terapia profilattica in favore di una terapia pre-emptive ai primi segni di infezione, è ugualmente valida.

3.4 Terapia

Date la scarsa tolleranza del paziente a procedure diagnostiche invasive e la restrizione delle possibilità terapeutiche dettata dalla nefrotossicità di alcuni farmaci antimicrobici e dalle possibili interferenze con la terapia immunosoppressiva, la gestione clinica di un paziente con sospetta infezione è molto complessa.

La possibilità di disporre di strumenti diagnostici sempre più rapidi ed efficaci (tecniche microbiologiche molecolari, TC, RMN) permette di identificare in breve tempo l'agente eziologico del processo infettivo per iniziare una terapia antimicrobica mirata.

Qualora si manifestasse la necessità di iniziare una terapia empirica è consigliabile usare antibiotici attivi sui GRAM negativi come piperacillina/tazobactam o imipenem.

I dosaggi dei farmaci immunosoppressori dovrebbe essere ridotto (soprattutto in caso di infezioni virali) fino alla risoluzione del processo infettivo.(2, 4)

Polyomavirus BK

Nel 1971, Sylvia Gardner documentò il primo caso di infezione da Polyomavirus BK in un paziente sottoposto a trapianto renale da donatore vivente che, a quattro mesi dall'intervento, venne ricoverato presso il St. Mary's Hospital di Londra per l'insorgenza di anuria e dolore nella sede del trapianto. Le indagini condotte durante il ricovero evidenziarono una stenosi ureterale che rese necessario un intervento chirurgico per resecare il tratto stenotico ed eseguire una nuova anastomosi. Per identificare la causa di questa stenosi vennero raccolti ed analizzati le urine ed il siero del paziente.

La citologia urinaria dimostrò la presenza di cellule mononucleate contenenti inclusioni basofile intranucleari. Alla microscopia elettronica, tali inclusioni si dimostrarono essere particelle virali con un diametro

medio di 43-46 nm, morfologicamente molto simili ai virus del genere Polyomavirus, appartenente alla famiglia Pa. Po. Va viridae. Le stesse inclusioni vennero osservate anche in un campione di tessuto del tratto di uretere resecato e nelle cellule di coltura inoculate con le urine del paziente.

Le indagini sierologiche, infine, permisero di individuare una somiglianza antigenica tra il virus che infettava il paziente e il virus SV40, oltre a dimostrare una cross-reazione tra l'antisiero rivolto verso quest'ultimo ed il siero del paziente.

Tutte queste considerazioni portarono Sylvia Gardner a concludere che la causa della stenosi ureterale fosse un'infezione virale ad opera di un virus fino ad allora sconosciuto ma collocabile, per le sue caratteristiche, nel gruppo dei virus del genere Polyoma.

Essendo B. e K. le iniziali del paziente in cui per la prima volta venne isolato, il virus venne chiamato "Polyomavirus BK"(BKV). (5)

Quasi contemporaneamente un altro Polyomavirus, molto simile seppur antigenicamente distinto, venne isolato da campioni bioptici di tessuto cerebrale di un paziente con Linfoma di Hodgkin, affetto da una rara malattia demielinizzante: la leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML). Quest'ultima è una drammatica complicanza tardiva di una serie di patologie particolarmente invalidanti dal punto di vista immunologico, quali leucemie, linfomi e AIDS. "Polyomavirus JC"(JCV) il cui nome, anche in questo caso, deriva dalle iniziali del paziente in cui venne osservato per la prima volta, è ritenuto il principale agente eziologico della PML. (6) Ben presto fu chiaro che anche JCV poteva infettare i pazienti sottoposti a trapianto renale rendendosi causa di un'infezione da solo o in associazione con BKV. (7)

Dal 1971 ad oggi, sempre più attenzione è stata dedicata ai Polyomavirus ed in particolare a BKV, considerato un agente patogeno responsabile di alcune tra le più importanti complicanze infettive post-trapianto renale.

Vediamo ora più in dettaglio quali sono le caratteristiche biologiche di questo virus.

1. Classificazione tassonomica

Polyomavirus BK appartiene, insieme ad altre specie, derivate tutte da un unico progenitore, al genere Polyomavirus attualmente considerato l'unico genere della famiglia Polyomaviridae.

La classificazione che vedeva i generi Papillomavirus e Polyomavirus compresi nella famiglia dei Pa.Po.Va viridae, risulta ormai obsoleta.

I virus appartenenti alla famiglia sono: (8)

1. African green monkey polyomavirus (AGMPyV)
2. Baboon polyomavirus 2 (BPyV2)
3. Bovine polyomavirus (BPyV)
4. Budgerigar fledgling disease virus (BFPyV)
5. Hamster polyomavirus (HaPyV)
6. Polyomavirus JC (JCV)
7. Polyomavirus BK (BKV)
8. Merkel cell polyomavirus (MCPyV)
9. Murine pneumotropic virus (KPyV)
10. Murine polyomavirus (MPyV)
11. Rabbit kidney vacuolating virus (RKV)
12. Simian virus 40 (SV-40)
13. Simian virus 12 (SV-12)

Si tratta di virus molto diffusi tra i vertebrati. L'infezione, se al di fuori delle cellule dell'ospite naturale (diverso per ogni virus appartenente alla famiglia), è generalmente abortiva ma può indurre la trasformazione in senso oncogenico di diversi tipi di cellule. Tale caratteristica spiega l'origine del nome "Polyomavirus": "poly"-multiple-"oma"-neoplasie-. (9, 10)

Tra tutte le specie appartenenti alla famiglia, solo tre sono state isolate nell'uomo. Si tratta in particolare di Polyomavirus JC, di Merkel cell Polyomavirus e di Polyomavirus BK. Il ruolo di SV40 nel causare malattie nell'uomo non è ancora completamente chiarito anche se è stato ipotizzato un possibile coinvolgimento nella patogenesi di alcune neoplasie. (11, 12, 13)

In aggiunta a quelli sopraelencati, vanno menzionati anche il virus KI e il virus WU, recentemente isolati nelle secrezioni respiratorie di alcuni pazienti e responsabili, appunto, di un'infezione delle vie aeree superiori. (10)

Attraverso indagini sierologiche e analisi genetiche, sono stati isolati quattro sottotipi di Polyomavirus BK, rispettivamente denominati BK-I, BK-II, BKIII e BKIV.

Tra questi, BKV sottotipo I, che a sua volta può essere suddiviso in quattro sottogruppi (Ia, Ib-1, Ib-2 e Ic) sulla base di piccole differenze nella sequenza del DNA, è sicuramente il più diffuso.(14)

2. Caratteristiche biologiche

Tutti i virus appartenenti alla famiglia dei Polyomaviridae hanno caratteristiche comuni.

Si tratta di virus a DNA, con un capsido icosaedrico sprovvisto di envelope.

Le molecole virali misurano dai 40.5 nm ai 44.0 nm e sono costituite per l'88% da proteine e per il 12% da DNA.

Dal punto di vista biologico, SV40 e Murine Polyomavirus (MPyV) sono i meglio caratterizzati ed è proprio sulle osservazioni condotte su questi virus che ci baseremo per descrivere Polomavirus BK.

2.1 Genoma virale

Pur differenziandosi notevolmente tra loro, sia per il comportamento biologico che per le manifestazioni patologiche, i virus appartenenti

alla famiglia dei Polyomaviridae, presentano un'elevata percentuale di omologia, che nel caso di Polyomavirus BK, è del 75% con JCV e del 70% con SV40.

Il genoma di Polyomavirus BK è costituito da un'unica molecola di DNA a doppia elica di 5153 paia di basi. Questo minicromosoma, di forma circolare, è complessato con le proteine istoniche cellulari H2A, H2B, H3 e H4, e può essere diviso in tre regioni funzionali :

1. Regione codificante precoce

È la prima parte del genoma ad essere trascritta e tradotta nel ciclo vitale del virus. Si tratta di una porzione di DNA di 2.4 kbp che codifica per due proteine regolatrici virali chiamate Tumor antigen (o semplicemente T-antigen). Queste proteine sono prodotte per splicing alternativo a partire da un comune precursore di mRNA pre-messaggero e sono denominate, in base alla loro dimensione, large T-antigen e small t-antigen (T-Ag e t-Ag).

Large T-antigen è considerato il regolatore del processo infettivo. Si tratta di una proteina provvista di molteplici attività enzimatiche e di un'elevata capacità di legare sia il DNA sia numerose proteine cellulari. Queste caratteristiche rendono ragione del ruolo fondamentale di large T-antigen nell'orchestrare la produzione di mRNA precoce, nel dare inizio alla replicazione del DNA virale e nell'avviare la trascrizione dei geni tardivi attraverso l'attivazione, insieme ai fattori trascrizione cellulari, dei promotori virali tardivi. Legandosi con pRb (retinoblastoma susceptibility protein) nella sua forma iperfosforilata, questa proteina permette il prematuro rilascio del fattore di trascrizione E2F, che stimola le cellule quiescenti a entrare nella fase S del ciclo cellulare e, dopo aver stabilito un adeguato ambiente cellulare, recluta direttamente il complesso DNA-polimerasi della cellula ospite per iniziare la sintesi bidirezionale di DNA virale. Large T-antigen rappresenta un elemento fondamentale per il virus. Contiene domini multipli alcuni dei quali inattivano

proteine della famiglia del retinoblastoma o di p53, sovvertendo il processo di apoptosi.(9, 15)

Numerosi studi hanno dimostrato che T-Ag è, tra le proteine codificate dal virus, il principale bersaglio della risposta immunitaria T cellulare.(16) Nel sangue di donatori sani ma con anticorpi diretti contro il virus, troviamo infatti linfociti T CD8+ diretti contro large T-Antigen. Questi dati suggeriscono che la replicazione di BKV nei siti di latenza virale mantiene intatta la memoria immunologica che consente di controllare l'infezione.(17)

Diverso è il ruolo di small t-antigen, probabilmente coinvolto nella trasformazione cellulare e di ausilio per l'attività di large T Antigen. Tuttavia, si tratta solo di ipotesi. Non possiamo dire, infatti, che il ruolo di questa proteina sia stato completamente chiarito, dal momento che alcuni esperimenti hanno dimostrato che la replicazione virale procede anche in sua assenza.(18)

2.Regione codificante tardiva

E' un segmento di DNA di 2.3 kb, contenente informazioni genetiche per le proteine strutturali del capsido: la proteina maggiore (VP1) e le due proteine minori (VP2 e VP3), tutte derivate da un unico mRNA precursore attraverso un processo di splicing alternativo.

La regione codificante tardiva codifica anche per una proteina denominata "agnoproteina", il cui ruolo nel ciclo replicativo di Polyomavirus BK rimane ancora da chiarire. Nel virus SV40, è stato ipotizzato che l' agnoproteina possa avere un ruolo nell' organizzazione dei capsomeri, incrementando così la produzione del virus. Inoltre, interazioni dirette tra T-Ag e agnoproteina sembrano, almeno nel virus JC, modulare la replicazione virale e la trascrizione del virus durante l'infezione. (18)

3. Regione non codificante regolatrice (non coding regulatory region o NCCR)

NCCR misura 300-500 bp ed è collocata tra le due regioni precedenti. Questo segmento di DNA contiene la sequenza di inizio della replicazione virale (*ori*), il TATA box, il sito di legame per large T antigen, i siti di legame per i fattori di trascrizione cellulari, un promotore e un potenziatore per le trascrizione dei geni precoci e tardivi. La regione enancher di BKV consiste in tre ripetizioni di 68 bp che sono soggette a delezioni e riarrangiamenti nelle diverse varietà di BK (nella varietà archetipale di BKV, per esempio, è stata trovata nella NCCR una sola sequenza di 68 bp).(18)

2.2 Struttura del capside

Il capside virale, di forma icosaedrica, è costituito da tre proteine strutturali: VP1, VP2, VP3, tutte codificate dal genoma virale. Basandosi sulle osservazione sulla ormai chiarita struttura del Polyomavirus murino e dell' SV40, possiamo ipotizzare anche la struttura dei capsidi di BKV e JCV. Si pensa che ogni capside contenga 360 molecole di VP1 arrangiate in 72 subunità pentameriche. Ogni pentamero è associato con una singola molecola di VP2 o VP3 per formare il singolo capsomero. L'estremo C-terminale di ogni molecola di VP1 si estende per ancorare insieme i capsomeri vicini.(18)

2.3 Recettori virali

Sia JCV che BKV necessitano, per iniziare il loro ciclo vitale, di legarsi attraverso il loro recettore all'acido sialico presente sulla superficie cellulare. (12, 18)

Lo specifico recettore cellulare per BKV sembra essere una glicoproteina legata attraverso un residuo N-terminale all'acido sialico sulla cellula ospite in posizione α (2, 3). Tale recettore ha la funzione di mediare l'attacco e la successiva penetrazione del virus. Alcuni

recenti studi dimostrano il coinvolgimento dei gangliosidi GD1b e GT1b nell' iniziale interazione tra BKV e le cellule suscettibili.(18, 19, 20). Sia i gangliosidi che il residuo di acido sialico, sembrano in grado di supportare l'infezione da BKV indicando che il virus può usare alternativamente diversi recettori sulla stessa cellula o su diversi tipi cellulari.(12)

2.4 Ciclo vitale del virus

Così come gli altri virus a DNA, anche BKV e JCV entrano nella cellula per endocitosi penetrando dapprima nel citoplasma e successivamente nel nucleo delle cellule bersaglio, dove la replicazione e la moltiplicazione virale possono avere luogo.

Nel caso di BKV, il virus entra piuttosto lentamente nella cellula attraverso un processo di endocitosi caveolo-mediato, della durata di quattro ore circa e successivamente, ancorandosi ai microtubuli e grazie ai sistemi di trasporto del citoscheletro, avanza verso il nucleo, la sua destinazione intracellulare. (21)

Una volta arrivati nel nucleo i virus perdono il capsido e danno inizio al loro ciclo replicativo, che si sviluppa in tappe successive.

Il primo evento è rappresentato dalla trascrizione dei geni virali precoci (large T antigen e small t antigen), alla quale segue una prima fase di replicazione del DNA. Una volta completato questo processo, si assiste all'espressione sia dei geni virali tardivi VP1, VP2 e VP3 che dell'agnoproteina.

La regione promotrice della trascrizione per BKV non è ancora stata completamente caratterizzata. Alcuni studi hanno individuato in questa regione numerosi siti di legame per diversi fattori di trascrizione quali NF-1, Sp1, AP1, C/EBP β e NF κ B.

All'interno della NCCR invece, sono state identificate regioni denominate rispettivamente: glucocorticoid response element (GRE), progesteron response element (PRE), estrogen response element (ERE), responsabili dell'incremento della replicazione virale dopo stimolazione ormonale. Questa ipotesi è sostenuta dall'osservazione

di un incremento di cellule con inclusioni virali nel sedimento urinario di donne in gravidanza. L'espressione dei geni precoci, con la successiva sintesi di large T-antigen e small t-antigen, potenzia ulteriormente l'attività promotrice della regione ERE.

Una volta che il genoma virale è stato replicato, large T-antigen inibisce la trascrizione dei geni precoci e stimola quella dei geni tardivi, alla quale segue la sintesi delle proteine strutturali VP1, VP2 e VP3. In questo modo, si rende possibile l'assemblaggio del capsido contenente il genoma virale complessato con le proteine istoniche.

Il rilascio dei virioni neoformati avviene attraverso lisi della cellula ospite, anche se non è escluso che i virus possano attraversare la membrana cellulare utilizzando sistemi di trasporto sulla superficie della cellula.(9, 18)

3. L'infezione da Polyomavirus BK

3.1 Epidemiologia

Indagini sierologiche condotte sulla popolazione generale, hanno dimostrato che l'infezione primaria in genere avviene durante l'infanzia, intorno ai quattro anni di età. La sieroprevalenza è minima a sei mesi, quando il bambino perde gli anticorpi materni, mentre tende a crescere progressivamente fino a raggiungere, nell'età adulta, il suo massimo. Numerosi studi dimostrano infatti che circa il 75% della popolazione ha anticorpi IgG diretti contro Polyomavirus BK (il range va dal 46% al 94% a seconda delle casistiche).(9)

3.2 Modalità di trasmissione

L'ipotesi che l'infezione venga trasmessa per via respiratoria sembra essere la più accreditata ed è sostenuta dal riscontro di un elevato titolo anticorpale diretto contro il virus in concomitanza con un'infezione delle alte vie respiratorie. Tuttavia, altre vie di

trasmissione sono state ipotizzate. Si pensa infatti che l'infezione possa essere contratta attraverso l'ingestione di cibo o acqua contaminati, in seguito a trasfusioni di sangue o plasma o a trapianti di organo. Anche le possibilità di una trasmissione sessuale o per via placentare sono state considerate e, per quanto si tratti di ipotesi meno convincenti, non sono state completamente escluse. (9)

3.3 Manifestazioni cliniche nell'ospite immunocompetente

L'infezione, negli individui con un'immunità cellulare intatta, decorre generalmente asintomatica ma in una percentuale di pazienti può presentarsi con una sintomatologia simil-influenzale caratterizzata da febbre, malessere e infiammazione delle alte vie respiratorie.(19)

Rari casi di tonsillite e ancor più rari casi di cistite e di sindrome nefritica presumibilmente associati all'infezione primaria da Polyomavirus BK sono stati riportati.(9)

3.4 L'immunità contro BKV e la riattivazione virale

La risposta immunitaria umorale contro il virus consiste nella produzione di IgM, IgG e IgA dirette contro la proteina maggiore del capsido VP1 e contro large T-antigen. Tuttavia è l'immunità cellulare che ricopre un ruolo di primo piano nel controllare la replicazione virale all'interno delle cellule ospiti.

A seguito dell'infezione primaria infatti, il virus non viene eliminato ma rimane latente, localizzandosi preferibilmente nel tessuto cerebrale, nei linfonodi, nel rene e nell'epitelio di transizione che riveste le vie urinarie (Figura 2). Qualunque condizione che alteri o riduca l'efficienza dell'immunità cellulare di un individuo (per esempio un'infezione da HIV, un trapianto di un organo solido o di midollo osseo) favorisce la ripresa dell'attività replicativa virale, dimostrabile sia attraverso l'osservazione microscopica del sedimento urinario, nel quale sono presenti numerose decoy cells, sia

quantificando la carica virale nelle urine del paziente. Non si tratta necessariamente di condizioni patologiche: non è raro infatti osservare una riattivazione virale durante la gravidanza e nei pazienti anziani senza implicazioni cliniche di nessun genere.(9, 19)

3.5 Manifestazioni cliniche dell'infezione attiva nel paziente immunocompromesso

La riattivazione virale richiede una riduzione della risposta immunitaria ed una attivazione delle cellule ospiti.

A seconda del tipo di paziente e della sua storia clinica, il virus può avere diversi organi bersaglio. (19)

E' possibile individuare cinque diversi modelli patologici attraverso i quali il virus si manifesta clinicamente nel paziente immunocompromesso.

- **PATTERN CITOPATICO**

Effetto citopatico diretto indotto dalla replicazione virale e lisi della cellula ospite. Il prototipo di questo modello è la leucoencefalopatia multifocale progressiva. Le multiple aree demielinizzate sono conseguenza della perdita progressiva di oligodendrociti infettati da JCV.

- **PATTERN CITOPATICO E INFIAMMATORIO**

All' attività replicativa del virus si associa una risposta infiammatoria di grado variabile che contribuisce a provocare un danno tissutale. L'infiltrato infiammatorio comprende polimorfonucleati, macrofagi, monociti, linfociti e plasmacellule. Questo modello è alla base dello sviluppo della nefropatia interstiziale tipica dei pazienti trapiantati renali (BKVN).

- PATTERN DA "RICOSTITUZIONE IMMUNITARIA"

Nei pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo si assiste, superata la fase di condizionamento, alla ricostituzione di una risposta immunologica contro il virus, prevalentemente sostenuta da neutrofili, linfociti T e cellule NK. L'intensa reazione infiammatoria che ne consegue può essere causa di manifestazioni patologiche quali ad esempio la cistite emorragica.

- PATTERN AUTOIMMUNE

Anche se i meccanismi alla base di questo modello patologico non sono completamente chiari, sembra che l'infezione da BKV possa indurre un risposta autoimmunitaria, con formazione di anticorpi anti-DNA e anti-istoni, in soggetti con patologie autoimmuni preesistenti come ad esempio il LES. L'osservazione di una riattivazione della replicazione virale contemporaneamente al rialzo del titolo autoanticorpale sostiene questa ipotesi.

- PATTERN ONCOGENICO:

BKV potrebbe secondo alcuni autori, attivare alcuni oncogeni (p53, Rb) ed essere per questo implicato nella patogenesi di alcune neoplasie quali ependimomi, mesoteliomi, carcinomi uroteliali e patologie linfoproliferative.(9)

La prevalenza di cistite emorragica nei pazienti che ricevono un trapianto di midollo osseo è del 10%.

Si tratta di un'infezione particolarmente severa e dolorosa che, non di rado, richiede di ricorrere alla chirurgia per risolvere il quadro emorragico.

Nei pazienti sottoposti a trapianto di midollo con sospetta cistite da BKV, è necessario escludere che alla base del processo infiammatorio vi sia una reazione indotta dall'acroleina (metabolita attivo della ciclofosfamide). È stato infatti dimostrato che il 50% dei pazienti trapiantati di midollo elimina BKV nelle urine pur restando asintomatico. Le caratteristiche cliniche (presentazione tardiva e durata prolungata dei sintomi in caso di cistite da BKV) e la quantificazione della carica virale nelle urine (elevati valori di viruria in genere superiori a 10^{10} copie/mL) orientano nella diagnosi differenziale. La viremia può essere spesso assente.(1)

Altre manifestazioni nei pazienti con trapianti di midollo, anche se molto rare, sono:

- disfunzione epatica
- polmonite interstiziale
- insufficienza renale.

Nei pazienti HIV positivi, i segni di replicazione virale attiva (viruria e decoy cells) cominciano generalmente a comparire quando il numero dei linfociti CD4+ scende al di sotto dei $200/\mu\text{L}$.

Nel caso in cui il numero di linfociti scenda al di sotto dei $50/\mu\text{L}$, possono presentarsi:

- cistite emorragica
- nefropatia
- polmonite
- retinite
- meningoencefalite.

Talvolta, tali patologie possono presentarsi contemporaneamente, causando una grave insufficienza multiorgano.

Nei pazienti sottoposti a trapianto renale, invece, l'infezione attiva si manifesta con una nefropatia interstiziale o, più raramente, con una stenosi ureterale. Anche se è interessante notare come la drastica riduzione dell'incidenza di stenosi ureterali (8% degli ureteri analizzati) (19) abbia coinciso con l'adozione della ciclosporina come farmaco antirigetto, una reale associazione tra i due eventi non è mai stata dimostrata. L'ipotesi più probabile è che il perfezionamento delle tecniche chirurgiche con conseguente riduzione del trauma tessutale e la consuetudine di posizionare stent ureterali lasciati in sede nel primo periodo post-trapianto, abbiano ridotto il numero di casi di stenosi.

L'interessamento di altri organi, seppure poco frequente, è comunque possibile. Sono infatti stati descritti alcuni casi di cistite emorragica, di interessamento del colon con formazione di lesione ulcerose e di vasculopatia sistemica, tutti secondari ad infezione da BKV. Raramente Polyomavirus BK può essere responsabile, nei pazienti trapiantati, di una sindrome neurologica molto simile alla leucoencefalopatia multifocale progressiva causata da JCV. (22)

Non è ancora del tutto chiaro quali sono le manifestazioni cliniche di un' infezione da Polyomavirus BK nei pazienti sottoposti a trapianto di organo solido diverso dal rene.

La possibilità che vi possa essere un coinvolgimento renale anche in questo caso è sostenuta dalla dimostrazione che il 15% dei pazienti trapiantati elimina il virus con le urine. Tuttavia, il numero di casi documentati di viremia attiva e di nefropatia da Polyomavirus BK sviluppatasi sui reni nativi è esiguo.

Sulla base di tali dati, anche se BKVN deve essere considerata tra le possibili cause di insufficienza renale in questi pazienti, molti autori ritengono che non sia necessario applicare lo screening comunemente adottato per i pazienti sottoposti a trapianto renale.(23, 24)

La nefropatia da Polyomavirus BK

1. Epidemiologia

Il primo caso di nefropatia da Polyimavirus BK sviluppatasi in un rene trapiantato fu descritto nel 1978 da Mackenzie.(19)

Il numero di casi registrati è andato progressivamente aumentando dagli anni Settanta ad oggi e BKVN può essere considerata la principale complicanza infettiva post-trapianto (l'incidenza supera di 50-100 volte quella dell'infezione produttiva da CMV). (19)

Tale aumento è da imputare principalmente all'adozione, nel corso degli anni, di nuovi e sempre più potenti farmaci immunosoppressori che, se da una parte hanno ridotto significativamente gli episodi di rigetto, dall'altra hanno aumentato la suscettibilità alle infezioni dei pazienti trapiantati.

Una percentuale compresa tra l'1% e il 10% dei pazienti che ricevono un trapianto renale sviluppa una nefropatia da Polyomavirus BK in un lasso di tempo variabile.(25)

L'incidenza registrata è massima nel primo anno dopo l'intervento, con un picco tra il nono e il decimo mese post-trapianto.(26, 27, 28)

2. Fattori di rischio

Numerosi sono i fattori che possono determinare una riattivazione della replicazione virale e quindi aumentare il rischio di sviluppare una nefropatia vera e propria.

Per maggiore semplicità possiamo suddividerli in due gruppi: (29)

1. fattori di rischio legati al donatore :

- infezione attiva da Polyomavirus o da Cytomegalovirus
- donatore cadavere
- ischemia fredda superiore alle 24 ore

- tipizzazione del donatore: assenza dell'allele HLA C7

2. fattori di rischio legati al ricevente:

- età avanzata
- sesso maschile
- razza caucasica
- comorbilità (diabete mellito)
- mismatches HLA tra donatore e ricevente maggiori di 4
- tipizzazione del ricevente: assenza dell'allele HLA C7
- rigetto acuto e successivo trattamento (boli di steroide e ATG)
- terapia immunosoppressiva (Tacolimus e MMF)

Per quanto l'infezione possa derivare sia dal donatore che dal ricevente, Hirsch et al riportarono in uno studio che circa l'85% dei pazienti con nefropatia era già sieropositivo prima di ricevere il trapianto suggerendo così che la combinazione donatore sieropositivo e ricevente sieronegativo non ha la stessa importanza che può avere nell' infezione da Cytomegalovirus.(29, 30, 31)

Bohl et al. , d' altra parte, hanno dimostrato l' importanza del donatore come sorgente di infezione da BKV soprattutto nei pazienti pediatrici e hanno ipotizzato che la mancanza dell' allele HLAC7, sia nel ricevente che nel donatore, possa condizionare lo sviluppo di nefropatia, essendo questo allele coinvolto nella capacità di un individuo di controllare l'infezione.(32)

Relativamente alla correlazione tra l' impiego di tacrolimus e MMF e il rischio di sviluppare BKVN, occorre fare alcune precisazioni.

In considerazione del fatto che negli anni Ottanta e all'inizio degli anni Novanta (quando la terapia immunosoppressiva era basata quasi esclusivamente su azatioprina e ciclosporina), la nefropatia da Polyomavirus era una patologia quasi sconosciuta e che la sua prevalenza è progressivamente aumentata con l' introduzione di nuovi

farmaci immunosoppressori quali appunto il tacrolimus il micofenolato, è stata ricercata un' associazione tra questi due eventi.

Anche se secondo alcuni autori come ad esempio Mengel et al, il tacrolimus (soprattutto se a livelli plasmatici superiori agli 8 ng/dL) e MMF ad alte dosi aumentano il rischio relativo (odd ratio) di sviluppare nefropatia fino a 13 volte, sono stati documentati casi di BKVN in pazienti in terapia con azatioprina e ciclosporina o con protocolli liberi dagli inibitori della calcineurina, con sirolimus e MMF. (19)

Anche la terapia con Thymoglobuline sembra essere associata ad un aumento del rischio di BKVN, ma solo se utilizzata come terapia per il rigetto acuto.(33, 34)

In seguito a queste osservazioni, il ruolo dei singoli farmaci nel favorire lo sviluppo di BKVN è ancora incerto, mentre è opinione condivisa che una condizione di elevata immunosoppressione, indipendentemente dal tipo di terapia adottata, correla direttamente con il rischio di BKVN.(35, 36)

3. Manifestazioni cliniche

La riattivazione virale è, in una prima fase, assolutamente silente non essendo accompagnata dai tipici segni e sintomi che possono suggerire la presenza di un' infezione virale in atto quali, ad esempio, febbre, malessere, mialgie, leucopenia, anemia o trombocitopenia.

Gli unici segni e sintomi si manifestano in fase avanzata e consistono principalmente in un'alterazione degli indici di funzionalità renale nel caso della nefropatia o, qualora la sede della replicazione del virus fosse selettivamente localizzata a livello dell'uretere, in un quadro di uropatia ostruttiva. L'infiammazione dell'epitelio ureterale infatti, esita inevitabilmente in fibrosi che, a sua volta, determina una stenosi che molto spesso comporta la necessità di un intervento di resezione e reimpianto per risolvere il quadro ostruttivo.

4. Diagnosi

Per quanto secondo molti autori la valutazione istologica di un campione bioptico è necessaria per formulare la diagnosi di nefropatia da Polyomavirus BK, altri metodi diagnostici possono affiancare o, in alcuni casi, sostituire la biopsia renale.

4.1 Citologia urinaria

La citologia urinaria è stata utilizzata, sin dagli anni Settanta, come metodo per documentare l'infezione da Polyomavirus. Attraverso un'analisi del sedimento urinario con il microscopio a contrasto di fase o, molto più spesso, con il metodo di Papanicolau, è possibile identificare le cellule infettate, denominate "decoy cells". Tali cellule sono caratterizzate da un nucleo basofilo, arrotondato e generalmente più largo rispetto a quelli delle normali cellule tubulari e di transizione. All'interno dei nuclei, circondati da un alone perinucleare più chiaro, la cromatina appare addensata ed è possibile vedere delle vere e proprie inclusioni virali.(37, 38)

L'asintomatica desquamazione di cellule uroteliali con la morfologia di decoy cells può essere riscontrata nel 10% fino al 60% dei pazienti trapiantati sani.(24, 27, 29)

La presenza delle decoy cells infatti, non si osserva solo in caso di nefropatia ma può essere secondaria alla replicazione virale a livello tubulare renale o a livello uroteliale, senza coinvolgimento del rene. Le cellule devono pertanto essere considerate un marker di riattivazione virale utile per identificare i pazienti a rischio sviluppare nefropatia e che, pertanto, dovranno essere sottoposti a ulteriori e più accurate indagini diagnostiche. (39, 40, 41, 42, 43)

E' stato infine osservato da Hayat che spesso nei pazienti con insufficienza renale terminale vi è una riattivazione virale con eliminazione di decoy cells che persiste anche dopo il trapianto.(44)

Mentre il valore predittivo positivo delle decoy cells è piuttosto basso (25-30%), il valore predittivo negativo è molto alto, intorno al 99% e forse più.

Data l'elevata sensibilità di questa metodica (99-100%), l'assenza di decoy cells nelle urine permette di escludere la presenza di un'infezione virale attiva.(37, 38, 45, 46)

Nonostante l'analisi citologica urinaria venga generalmente considerata positiva quando è possibile osservare almeno 10 decoy cells per preparazione citologica, la presenza di una sola di queste cellule può essere considerata marker di riattivazione virale. Dal momento che non fornisce nessuna informazione clinica aggiuntiva, la quantificazione delle cellule osservate non è quindi necessaria.(19)

L'unico caso in cui la ricerca di decoy cells urinarie non può essere applicata come metodo di screening è il trapianto combinato di rene e pancreas dal momento che gli enzimi pancreatici sembrano degradare le decoy cells, riducendo la sensibilità di questa metodica.(24)

4.2 Sierologia

Negli anni Ottanta la misurazione degli anticorpi contro il virus con emoagglutinazione veniva usata per diagnosticare l'infezione.

Oggi questo metodo è stato abbandonato in favore di tecniche più sensibili.

E' stato osservato che i titoli anticorpali aumentano in caso di infezione attiva, dimostrata attraverso la determinazione PCR della carica virale nel sangue e nelle urine dei pazienti valutati.

S. Parmjeet et al, suggeriscono che un livello di IgG > di 0,577 optical density(OD)units e un livello di IgA o M > 0,041, sono fortemente indicativi di una riattivazione virale e, sulla base di questa osservazione, consigliano di utilizzare i test virologici come metodo di screening nei pazienti trapiantati.(47)

Utilizzando il metodo ELISA è possibile dimostrare la presenza nel siero di molti pazienti trapiantati di anticorpi di classe IgG, IgM e IgA diretti contro BKV-VP-1.

Tuttavia, l'esecuzione di test sierologici su donatore e ricevente non sembra essere utile per la stratificazione del rischio nei pazienti trapiantati.

Data l'elevatissima diffusione del virus, la maggior parte dei riceventi risulta sieropositiva rendendo impossibile individuare i pazienti che hanno un rischio maggiore di sviluppare BKVN.

Secondo alcuni autori inoltre, dal momento che il livello del titolo anticorpale non correla con il grado di riattivazione virale intrarenale (19) e che gli anticorpi preesistenti non sembrano avere un ruolo protettivo per l'infezione derivata dal donatore (mutazioni e riarrangiamenti nella NCCR), l'esecuzione dei test sierologici potrebbe in alcuni casi essere addirittura fuorviante. (9, 48)

4.3 Polymerase chain reaction(PCR)

Su campioni di urine e di plasma dei pazienti è possibile effettuare una PCR qualitativa e quantitativa, rispettivamente utilizzate per rilevare la presenza del virus nei campione biologici e quantificare la carica virale.

Il principale vantaggio offerto da questa metodica rispetto alla citologia urinaria, in caso di sospetta infezione da BKV, è quello di permettere la distinzione tra Polyomavirus JC e BK e di quantificare l'attività replicativa.(49)

La sensibilità di questa metodica è del 100% con un valore predittivo negativo del 100%. Controlli seriatati mediante PCR sono consigliati nei pazienti nei quali la citologia ha evidenziato la presenza di decoy cells e soprattutto durante il trattamento della nefropatia per valutare la risposta alla terapia.(50)

Nickeleit et al, hanno suggerito che il valore predittivo positivo della PCR (50%) aumenta fino all'80 % se la carica virale è superiore a 10000 copie /mL nel sangue e a 10000000 copie /mL nelle urine .

Anche se spesso viruria e viremia compaiono prima delle lesioni istologiche, la persistenza di una viremia e di una viruria rispettivamente superiori ai valori indicati per più di tre settimane può essere sufficiente a formulare la diagnosi di nefropatia presuntiva anche senza la conferma istologica. (19)

Dobbiamo comunque precisare che la viremia e soprattutto la viruria possono presentarsi spesso durante il primo anno post-trapianto come eventi asintomatici e transitori senza conseguenza cliniche per il paziente (prevalenza rispettivamente del 7-29% e del 35-57%). (28, 31)

E' stato osservato che la viruria donatore-derivata compare nei primi tre mesi mentre quella derivata dal ricevente è più tardiva.

Il rischio di viremia aumenta quando la viruria è superiore a 10000 copie /mL.(32)

Questo dato però non è condiviso da tutti gli autori: Funk et al infatti, hanno dimostrato che più del 90% della carica virale nelle urine risulta dalla replicazione nell'urotelio mentre solo una piccola parte deriva dalla replicazione di BK nelle cellule tubulari epiteliali. Tale osservazione, aiuta a spiegare per quale motivo è possibile osservare alcuni casi di viruria particolarmente elevata in assenza di viremia e nel contempo induce a non considerare i valori di viruria come predittivi di viremia.(51)

I saggi di PCR non sono standardizzati e variano da laboratorio a laboratorio con una variabilità interlaboratorio di un log di 10 circa.

Recentemente la misurazione nelle urine dell'mRNA per la proteina del capsido virale VP1 è stata proposta come strategia non invasiva.

Si tratta infatti di una metodica con una sensibilità e specificità molto elevate, rispettivamente del 93,8% e del 93,9%. Tuttavia, tale metodo diagnostico non viene utilizzato usato routinariamente ma solo in rari casi. (29)

4.4 Istologia

Due sono le caratteristiche morfologiche tipiche di BKVN nei campioni bioptici: (19)

1. Inclusioni virali intranucleari nelle cellule epiteliali tubulari e dell'epitelio parietale glomerulare.

Le cellule infettate dal virus mostrano numerosi effetti citopatici con nuclei di dimensioni da due a cinque volte superiori alla norma. Alla periferia nucleare è possibile vedere ammassi di cromatina addensata e inclusioni virali basofile (occasionalmente con aspetto a vetro smerigliato) circondate da un alone più chiaro non prominente.

L'osservazione del campione al microscopio elettronico può confermare la diagnosi: i virus sono visibili nei nuclei come particelle a struttura cristalloide di circa 40-45 nm di diametro. Le dimensioni permettono di distinguere il Polyomavirus da altri virus quali Adenovirus o Cytomegalovirus. Le inclusioni sono visibili anche nell'urotelio senza però avere nessun significato patologico, dal momento che possono essere secondarie ad una asintomatica riattivazione virale.

2. Danno cellulare e tissutale indotto dal virus, con infiammazione, atrofia tubulare e fibrosi interstiziale in proporzioni variabili.

La replicazione virale provoca lisi e necrosi della cellula ospite con conseguente esposizione della membrana basale tubulare che tuttavia rimane spesso intatta, rendendo possibile la rigenerazione epiteliale. Molto raramente si assiste ad una marcata distruzione tubulare con formazione di granulomi non necrotici.

In alcuni casi può essere possibile evidenziare, attraverso l'immunofluorescenza o la microscopia elettronica, depositi immuni a livello della membrana basale glomerulare e tubulare. Anche se il significato clinico di questo reperto non è stato ancora completamente chiarito, è stata osservato che la presenza di depositi si accompagna ad un maggiore grado di infiammazione e fibrosi. (52)

Le caratteristiche morfologiche osservate permettono di stadiare la nefropatia. (19)

STADIO A (nefropatia precoce)

Si osservano le inclusioni virali intranucleari (solo in alcuni rari casi sono assenti) ma non vi è lisi cellulare o esposizione della membrana basale tubulare. L'inflammatione a questo stadio è minima o assente, limitata alle foci di parenchima che mostrano segni di attivazione virale (localizzate soprattutto nella midollare).

L'atrofia tubulare e la fibrosi coinvolgono solo una piccola quota del campione bioptico (meno del 10%).

STADIO B (nefropatia florida)

Questo stadio è caratterizzato da una cospicua lisi delle cellule epiteliali, indotta dalla replicazione virale. Le membrane basali vengono distrutte e comunemente si osservano edema interstiziale e un infiltrato infiammatorio costituito prevalentemente da cellule mononucleate (plasmacellule e polimorfonucleati).

Il grado di atrofia tubulare e fibrosi può essere variabile, da minimo a moderato ma per definizione non interessa mai più del 50% del campione bioptico.

Sulla base del grado di coinvolgimento tubulare, con infiammazione e tubulite, lo stadio B può essere a sua volta suddiviso in :

STADIO B1: le lesioni coinvolgono meno del 25% del tessuto esaminato.

STADIO B2: il danno tessutale interessa dal 26 % al 49% del campione bioptico.

STADIO B3: caratterizzato da un coinvolgimento tubulare con danno e infiammazione superiore al 50%.

STADIO C (Fase tardiva o sclerosante):

L'inflammatione, se da una parte può favorire la clearance virale, dall'altra favorisce la fibrosi e l'atrofia tubulare che, a questo stadio, si estendono per oltre il 50% del campione bioptico. (49)

Al contrario di quanto osservato nello stadio A, le lesioni si localizzano prevalentemente nella corticale.

La nefropatia all stadio A è generalmente diagnosticata più precocemente (8,7 mesi post-trapianto), mentre gli stadi B e C vengono osservati in fase più tardiva (16 mesi). (19)

Nonostante la biopsia sia considerata il gold standard per la diagnosi di nefropatia, la percentuale di falsi negativi è comunque piuttosto elevata (dal 10 al 30 % dei casi)(1), soprattutto se ci troviamo di fronte ad una nefropatia allo stadio iniziale e se la biopsia non viene eseguita correttamente ma vengono prelevati solo frammenti di corticale.

La sensibilità e la specificità della diagnosi possono essere migliorate eseguendo test immunoistochimici sul campione bioptico (utilizzando anticorpi diretti contro il large T antigen di SV40 o la proteina VP del capsid virale, rispettivamente marker di replicazione e di formazione di virioni maturi) o saggi di ibridazione in situ (10 copie di BK virus per cellula equivalente distinguono l'infezione produttiva da quella latente). (19)

Attraverso queste metodiche, decisamente più sofisticate e non utilizzate routinariamente, è inoltre possibile confermare l'eziologia virale delle lesioni e distinguere se sono imputabili a BKV o a JCV. (53)

Diagnosticare istologicamente una nefropatia da Polyomavirus infatti, può risultare particolarmente difficoltoso poiché non è raro che essa si presenti in concomitanza di un rigetto acuto o con un quadro di tubulite e infiammazione interstiziale molto simile ad esso.

In questi casi, il sospetto clinico, la quantificazione della viremia e della viruria mediante PCR e soprattutto l'identificazione dell'espressione tubulare di MHC di classe II e di ICAM-1, tipica del

rigetto cellulare o del C4d lungo i capillari peritubulari, tipico del rigetto umorale, facilitano la diagnosi. (54, 55).

Il Cylex Immunoknow Test è un test in grado di monitorare il grado di funzionamento dell'immunità cellulare negli individui immunodepressi e può essere utile per identificare i pazienti a rischio di infezioni virali o a rischio di rigetto. Tale determinazione può essere utile in caso di biopsia borderline con tubulite e infiammazione interstiziale di non chiara origine o nei casi di viremia in assenza di lesioni istologiche documentabili. (56)

4.5 Microscopia elettronica

Si tratta di una tecnica utilizzata sporadicamente ma che permette di identificare virioni liberi nel campione di urine del paziente quando la carica virale supera le 1000000 copie /mL. L'eliminazione di virioni liberi viene generalmente osservata in pazienti con decoy cells positive . (19)

4.6 Algoritmo diagnostico

I pazienti possono essere divisi in quattro livelli di rischio

- **Livello 0:** NO RISCHIO

- **Livello 1:** BASSO RISCHIO.

Decoy cells, virioni liberi, PCR positiva ma con carica virale $< 10^4$ copie /mL nel sangue e a 10^7 copie /mL nelle urine.

POSSIBILE BKVN

- **Livello 2:** ALTO RISCHIO.

Carica virale $> 10^4$ copie /mL nel sangue e a 10^7 copie /mL nelle urine per tre settimane successive.

BKVN PRESUNTIVA.

- **Livello 3:** BKVN (diagnosi istologica).

Le decoy cells urinarie cominciano a comparire molto prima delle lesioni istologiche e, per questa ragione, controlli seriatati ogni tre mesi per i primi due anni post-trapianto permettono di individuare i pazienti a rischio nei quali deve essere verificata la presenza di viruria e viremia. Le determinazioni PCR devono essere eseguite ogni quattro settimane, insieme alla citologia urinaria.

La diagnosi di nefropatia presuntiva è sufficiente a giustificare la riduzione della terapia immunosoppressiva anche se l'esecuzione di una biopsia renale in questa fase è raccomandata .(19, 51)

5. Trattamento

L'approccio terapeutico in una paziente con nefropatia da BKV, presuntiva o diagnosticata istologicamente, non è ancora definito in modo chiaro e univoco.

Il primo passo, secondo molti autori, deve essere una riduzione del livello di immunosoppressione del paziente. In questo modo si consente all'immunità cellulare, "indebolita" dalla terapia antirigetto, di combattere naturalmente l'infezione. L'impossibilità, da parte del sistema immunitario del paziente trapiantato di rispondere efficacemente al virus è sicuramente l'evento centrale per lo sviluppo dell'infezione attiva da BKV e la successiva progressione verso la nefropatia. Nonostante anticorpi IgG specifici diretti contro il virus possano essere ritrovati nel 90 % della popolazione adulta, la risposta immunitaria umorale non sembra giocare un ruolo primario nel contenere l'infezione da Polyomavirus BK. Pazienti trapiantati, con un elevato titolo anticorpale contro BKV sviluppano infatti la nefropatia. Comoli et al, in un recente studio, hanno dimostrato, che la clearance virale avviene a seguito della ricostituzione di una risposta immunitaria cellulare diretta contro il virus.

Dopo aver ridotto la terapia immunosoppressiva è stata osservata una riduzione della carica virale nel sangue e nelle urine di pazienti con nefropatia istologicamente diagnosticata, parallelamente all'aumento del numero di linfociti circolanti secernenti γ -interferon quantificati attraverso un saggio ELISPOT. (48, 57, 58)

La sola riduzione dei dosaggi dei farmaci immunosoppressori si è dimostrata sufficiente in molti casi, portando a una sensibile riduzione del carico virale nel plasma dei pazienti e ad un miglioramento della funzionalità renale dopo circa tre mesi. (59, 60, 61, 62)

Scegliere come e quando intervenire modificando la terapia non è semplice e richiede un'attenta valutazione delle caratteristiche del paziente stesso e del rischio di rigetto acuto che una eccessiva

riduzione della dose di farmaci immunosoppressori inevitabilmente comporta. Non dimentichiamo infatti che gli episodi di rigetto costituiscono un fattore favorente per la progressione della nefropatia. Lo schema operativo più frequentemente utilizzato prevede, in prima istanza, la sospensione del MMF. Allo stesso tempo il dosaggio degli inibitori della calcineurina deve essere ridotto in modo da raggiungere livelli plasmatici compresi tra 100 e i 150 ng/mL per la ciclosporina e inferiori a 6 ng/mL per il tacrolimus.

Tuttavia, non si tratta di uno schema universalmente codificato: in alcuni casi per esempio può essere preferibile sostituire il tacrolimus con la ciclosporina o con il sirolimus, ottenendo ugualmente buoni risultati. (26, 29)

Nonostante la riduzione della terapia sia il primo passo e forse il più importante nella strategia terapeutica da adottare nei pazienti con una nefropatia da BKV, spesso deve essere considerato un vero e proprio trattamento antivirale, soprattutto nel caso in cui, dopo alcune settimane dalle modifiche del regime terapeutico, non si osserva una riduzione della viremia.

I farmaci antivirali come l'acyclovir, il ganciclovir, il foscarnet e la ribavirina non sembrano avere alcun effetto sull'evoluzione della nefropatia. Allo stesso modo, la citarabina, la vidaribina e l'amantadina, dopo un' iniziale entusiasmo, non si sono dimostrati efficaci in seguito a studi più approfonditi. (29)

Altri agenti antivirali quali il cidofovir, la leflunomide, l'FK778, i chinolonici e le immunoglobuline sono invece stati utilizzati ottenendo risultati positivi e, ad oggi, sono considerati gli unici farmaci consigliati nel trattamento della nefropatia. Tra questi la leflunomide e il cidofovir sembrano avere la maggior efficacia.

Vediamo ora nel dettaglio le caratteristiche di alcuni farmaci, il loro meccanismo d'azione e i possibili effetti collaterali.

CIDOFOVIR

E' un analogo nucleosidico(63) comunemente impiegato nella terapia della retinite da Cytomegalovirus nei pazienti con HIV. Il suo spettro di attività in vitro comprende i papovavirus, gli adenovirus, gli herpesvirus, gli iridiviruses e i poxvirus. L'utilizzo del cidofovir è limitato dalla sua nefrotossicità, che si estrinseca soprattutto se il farmaco viene somministrato ad alte dosi come accade, ad esempio, nel trattamento dell'infezione sistemica da Cytomegalovirus (5mg/kg alla settimana). Per questo motivo, la somministrazione di cidofovir è controindicata nei pazienti con una funzionalità renale già alterata. Può causare proteinuria e rialzo dei valori di creatinemia (dal 24%al 39% dei pazienti trattati).

Nonostante queste considerazioni è stato dimostrato che un trattamento a basse dosi (0,25-1mg/kg senza probenid) può essere utile nel trattamento della nefropatia da Polyomavirus.

Studi farmacocinetici hanno evidenziato che il cidofovir si concentra particolarmente nelle urine e nel tessuto renale che, come sappiamo, è il bersaglio primario dell' infezione. Una bassa dose di cidofovir, associata a una riduzione della terapia immunosoppressiva sembra essere efficace nel ridurre la viremia e non sembra avere effetti collaterali.

La dose consigliata è di 0,5 mg/kg per un minimo di quattro fino ad un massimo di dieci settimane di trattamento a seguito del quale la funzionalità del trapianto si stabilizza e la carica virale diminuisce, fino a scomparire, nel sangue e nelle urine. (29)

LEFLUNOMIDE

E' un farmaco abitualmente utilizzato per il trattamento dell'artrite reumatoide, ma è particolarmente indicata nei pazienti che hanno ricevuto un trapianto renale dal momento che, avendo un'attività immunomodulatrice, previene e ritarda lo sviluppo di un rigetto acuto e cronico.

La leflunomide è rapidamente metabolizzata in A77126, il suo metabolita attivo.

Il suo meccanismo di azione si basa sull'inibizione degli enzimi mitocondriali necessari per la sintesi dell'orotato nella via uridina e sull'inibizione di alcune tirosin-chinasi coinvolte nei meccanismi di segnale B-cellulari e T-cellulari.

Il micofenolato viene generalmente sospeso al momento dell'inizio del trattamento con leflunomide mentre i livelli plasmatici di tacrolimus devono essere mantenuti tra i 4 e i 6 ng/mL.

Si inizia la terapia con una dose di carico di 100 mg/die per cinque giorni, seguita da una somministrazione giornaliera di 20 mg fino a un massimo di 40 mg/die.

I livelli plasmatici da mantenere devono essere compresi tra i 40 e gli 80 µg/mL. (64, 65)

Gli effetti collaterali sono rari.

Al contrario del cidofovir, la leflunomide non ha effetti nefrotossici ma sono stati segnalati alcuni casi di emolisi e di epatotossicità che hanno reso necessaria la sospensione del farmaco.

FLUOROCHINOLONICI

Questo gruppo di farmaci inibisce la replicazione virale in vitro e sembra poter essere efficace anche in vivo nel controllare l'infezione. Un recente studio ha dimostrato l'effetto positivo di una dose giornaliera di gatifloxacina di 500 mg per un breve periodo nei pazienti trapiantati nei quali era stata osservata una viruria significativa alla quantificazione con PCR. Inoltre, l'esposizione alla ciprofloxacina sembra ridurre il carico virale nei pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo. L'efficacia di questa classe di farmaci resta comunque da valutare. (66, 67)

IMMUNOGLOBULINE

Hanno un'applicazione limitata, dal momento che non è ancora chiaro quale sia il ruolo dell'immunità umorale nel controllare l'infezione da BKV. L'assenza di dati clinici sufficienti a dimostrare la loro reale efficacia e il costo elevato del trattamento, ne limitano fortemente l'utilizzo. (68)

Nonostante i farmaci disponibili siano molteplici e molto diversi gli uni dagli altri, la mancanza di studi randomizzati e controllati e l'inevitabile considerazione che a ciascun trattamento si accompagna una riduzione della terapia immunosoppressiva sollevano dubbi sulla loro reale efficacia. (69, 70)

Il rischio di perdere il trapianto nonostante un trattamento antivirale specifico resta comunque molto elevato (dal 10% all'80% a seconda delle casistiche). (29)

Alcuni studi recentemente condotti da Moriyama et al. hanno dimostrato la capacità della pravastatina, un inibitore della HMG-CoA reduttasi, di inibire il processo di endocitosi cavolo-mediato del virus nella cella bersaglio. Lo studio dimostra che le statine, se incubate con cellule epiteliali tubulari e virus, inibiscono la sintesi della caveolina1, fondamentale per il meccanismo di internalizzazione di BKV nella cellula bersaglio. L'efficacia delle statine in vivo è ancora tutta da dimostrare ma questi risultati fanno sperare che esse possa avere in futuro un impiego nella prevenzione dell'infezione da BKV. (71)

In netto contrasto con quanto detto finora, è un articolo pubblicato nel luglio del 2008 da Acott, nel quale si descrivono una serie di esperimenti che dimostrano la capacità dell'acido micofenolico di inibire la replicazione virale in colture cellulari di Vero cells infettate con BKV. Secondo Acott, non solo l'acido micofenolico non dovrebbe essere sospeso nei pazienti con viremia ma anzi dovrebbe essere aumentato per potenziare il suo effetto antivirale che, come evidenziato dagli esperimenti condotti, sembra essere dose dipendente. (72)

Anche la ciclosporina, conosciuta per avere effetti antivirali in vitro, è stata proposta come farmaco inibitore della replicazione virale sulla base di studi condotti in vitro. (73)

Infine occorre ricordare che nel caso in cui rigetto e nefropatia si presentino nello stesso momento è indicato procedere in primo luogo trattando le complicanze immunologiche e solo successivamente, una volta stabilizzato il quadro di rigetto, si valuta la possibilità di adottare i diversi provvedimenti terapeutici a disposizione per arrestare la replicazione virale. (19, 74)

6. Decorso clinico e prognosi

Il timing della diagnosi resta senza dubbio il fattore determinante per la prognosi del trapianto. Il peggioramento degli indici di funzionalità renale, unico segno clinico di nefropatia, si osserva generalmente negli stadi avanzati.

Molto spesso, purtroppo, in questa fase il rene è già irreversibilmente compromesso. Per questo motivo è necessario individuare quelli che possono essere i segni precoci di una riattivazione virale allo scopo di monitorare i pazienti a rischio ed evitare la progressione delle lesioni renali fino ad una franca nefropatia.

Valori di creatininemia superiori a 2,2 mg/dL al momento della diagnosi testimoniano la presenza di un danno renale in fase avanzata e le possibilità di sopravvivenza a lungo termine del trapianto, a questo punto, sono minime. (59)

Nel 45% dei pazienti a cui è stata diagnosticata una nefropatia da BKV, nonostante un trattamento antivirale accompagnato da una riduzione della terapia immunosoppressiva, si osserva purtroppo un peggioramento progressivo e irreversibile della funzionalità renale che li condurrà nuovamente ad uno stadio di insufficienza renale terminale dopo 12-24 settimane di follow-up

. (9, 19)

La stadiazione istologica condiziona la prognosi del trapianto, poiché solo le lesioni che caratterizzano una nefropatia allo stadio iniziale (Stadio A) possono essere reversibili e regredire fino ad una completa restitutio ad integrum del rene trapiantato.

Se si interviene tempestivamente, la risposta alla terapia e il recupero di una buona funzionalità renale si osservano in un'elevata percentuale di casi (78%) e la sopravvivenza a lungo termine del trapianto non viene compromessa. (19)

Se la diagnosi dimostra uno stadio B la prognosi è variabile a seconda dell'entità delle lesioni ma è comunque possibile, soprattutto allo stadio B1, una regressione allo stadio A seguita da una risoluzione della nefropatia.

Negli stadi iniziali di nefropatia l'obiettivo è peraltro quello di limitare la progressione della nefropatia fino allo stadio C, caratterizzato da lesioni irreversibili. (dallo stadio A allo stadio C la percentuale di reni persi sale dal 10% all'80%). (51)

E' inoltre possibile che i diversi tipi di virus dimostrino un'alterata virulenza o un'alterazione nella sequenza genomica che può essere associata a forme più severe di malattia. La NCCR, dimostra infatti un'alto grado di variabilità (75)

Sono stati riportati alcuni di casi di pazienti che, dopo aver perso il rene per l'infezione da BKV, hanno ricevuto un nuovo trapianto.

Tra questi, solo una piccola percentuale ha sviluppato nuovamente una nefropatia (12%). (25)

Il decorso favorevole del secondo trapianto è da imputare molto probabilmente alla presenza dell'allele HLAC7 nel nuovo rene.

La transplantectomia non sembra prevenire la recidiva dell'infezione poiché il virus resta latente non solo nel rene trapiantato ma anche nel rene nativo e in tutto il tratto urinario. Per questo motivo, l'unica prevenzione possibile consiste nell'evitare un'eccessiva immunosoppressione nel paziente, monitorando periodicamente la viremia, che deve essere mantenuta al più basso livello possibile. (29)

Nel caso in cui il paziente sia candidato a ricevere un trapianto combinato, la nefrectomia deve invece essere considerata dal momento che in questi pazienti le possibilità di ridurre l'immunosoppressione sono limitate. (76)

E' comunque doveroso ricordare le potenzialità oncogeniche del virus a causa delle quali la trasplantectomia è considerata indicata da alcuni autori al fine di eliminare un sito di replicazione attiva. (9, 77, 78, 79)

7. La nefropatia da Polyomavirus JC

Per quanto JCV sia molto più noto come agente responsabile della leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML) nei pazienti immunodepressi, soprattutto se affetti da HIV, esso può essere causa, nei pazienti sottoposti a trapianto renale, di una nefropatia del tutto simile a quella da Polyomavirus BK.

Il virus può coinfectare insieme a BKV il rene trapiantato o essere da solo responsabile dello sviluppo della nefropatia (5% dei casi). (25)

Il primo caso è sicuramente il più frequente. La prevalenza di positività per il DNA di JCV nei pazienti trapiantati con una nefropatia da Polyomavirus è del 36,8% (80) mentre la prevalenza di riattivazione asintomatica è del 20% nei pazienti trapiantati sani, senza subire oscillazioni in relazione allo stato di immunosoppressione.(9).

Nella maggioranza dei casi, insieme al DNA di JCV, viene però anche amplificato il DNA di BKV.

Non è chiaro se i virus infettano contemporaneamente le stesse cellule o se le due infezioni coesistono all'interno di cellule differenti, replicandosi in siti di infezione distinti ma comunque molto vicini tra loro. Questa considerazione può essere più facilmente compresa ricordando che la replicazione virale è favorita da una serie di condizioni quali l'ischemia, il rigetto e il danno tissutale che ad essi consegue.

Nel 2001 A. Kazory e D. Doucloux documentarono il primo caso di nefropatia da JCV in assenza di segni di infezione da BKV e in

assenza di sintomi che dimostrassero un coinvolgimento neurologico come invece sarebbe stato ragionevole aspettarsi in un paziente immunodepresso. (81, 82)

Si conosce ancora poco della nefropatia causata da JCV nei pazienti trapiantati. L'iter diagnostico ricalca quello adottato per la nefropatia da BKV, impiegando la ricerca di decoy cells urinarie come metodo di screening, eventualmente seguita da altre indagini più specifiche. Tuttavia, è necessario fare alcune precisazioni soprattutto per quanto riguarda l'impiego della PCR. A differenza di quanto accade per l'infezione da BKV, non sono stati individuati valori precisi di viremia e di viruria al di sopra dei quali il rischio di sviluppare una nefropatia aumenta in modo significativo. Per quel che riguarda la viruria, dobbiamo inoltre tenere a mente che essa si presenta molto più frequentemente in pazienti completamente asintomatici e che non rappresenta un fattore di rischio per la progressione verso la nefropatia.

La diagnosi di certezza viene formulata dopo l'analisi di un campione bioptico e il trattamento consiste principalmente in una riduzione della terapia immunosoppressiva.

In conclusione, dobbiamo precisare che la nefropatia correlata a Polyomavirus JC, oltre ad essere meno frequente, progredisce più lentamente rispetto a quella causata da BKV e appare meno aggressiva di quest'ultima. (83, 84, 85, 86)

Il rischio di PML nei pazienti trapiantati con infezione da JCV resta fortunatamente molto basso. (25, 87, 88).

In conclusione, anche se si tratta di casi molto rari (due documentati), dobbiamo ricordare che la nefropatia da BK può presentarsi in associazione con altre infezioni virali quali quella da Adenovirus e da Cytomegalovirus. (19)

Scopo dello studio

Lo scopo dello studio è stato quello di identificare un percorso diagnostico sicuro per individuare la popolazione a rischio di sviluppare una nefropatia da BKV dopo trapianto renale.

E' stata pertanto valutata l'incidenza della positività per decoy cells nelle urine dei pazienti trapiantati durante il primo anno dal trapianto renale.

Successivamente, utilizzando la citologia urinaria come screening, è stata effettuata una valutazione della presenza o meno del virus nelle urine e nel sangue dei pazienti per poter quantizzare il rischio e, conseguentemente, la presenza di nefropatia da BKV.

1. Pazienti e metodi

1.1 Valutazione dei pazienti

Lo studio ha preso in considerazione 70 pazienti sottoposti a trapianto renale in un periodo di tempo compreso tra il novembre 2007 e il dicembre 2008 presso l'Unità Operativa di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, diretta dal prof. S. Stefoni.

Si tratta in particolare di 61 trapianti di rene singolo, 8 doppi trapianti e 1 trapianto combinato fegato-rene

Tra questi, 65 sono trapianti da donatore cadavere e 5 da donatore vivente.

A partire dal primo mese post-trapianto e successivamente ogni tre mesi per la durata di un anno, è stata ricercata la presenza di decoy cells in un campione di urine.

Nei casi in cui sono state osservate decoy cells urinarie, è stata eseguita una determinazione PCR qualitativa e quantitativa per BKV su sangue per ricercare e quantificare l' eventuale presenza di DNA virale.

Le determinazioni PCR sono state ripetute ogni quattro settimane e, in caso di viremia superiore ai livelli indicati dalla letteratura come cut-

off per formulare una diagnosi di nefropatia presuntiva da BKV (10000 copie/ml) (19), i pazienti sono stati sottoposti a biopsia renale. Per quanto riguarda i pazienti con persistente escrezione urinaria di decoy cells in assenza di viremia per BKV, si è proceduto ad eseguire una determinazione PCR qualitativa per JCV su sangue e urine.

In ultima istanza, una determinazione per BKV e JCV mediante PCR su sangue e urine è stata eseguita al termine del primo anno post-trapianto anche sui pazienti con citologia urinaria negativa durante tutto il follow-up. (Figura 1)

Al fine di valutare se all' interno della nostra casistica è possibile osservare un'associazione tra l'escrezione di decoy cells urinarie e i fattori di rischio riportati in letteratura, ogni paziente è stato caratterizzato considerando le seguenti variabili:

- Sesso
- Età al trapianto
- Età dialitica
- Eventuale terapia immunosoppressiva pre-trapianto
- Donatore (cadavere o vivente)
- Diabete
- HLA mismatches > 4
- Induzione (Basiliximab o ATG)
- Terapia immunosoppressiva (steroidi, ciclosporina, tacrolimus, MMF, sirolimus ed everolimus)
- Rigetto acuto
- Terapia del rigetto acuto (boli di steroide o ATG)
- Infezione da CMV

Ad ogni controllo, sono stati valutati i seguenti parametri:

- Emoglobina (g/ dL)
- Leucocociti

- Proteinuria (mg/dL)
- Creatininemia (mg/dL)
- VFG (calcolato secondo MDRD)

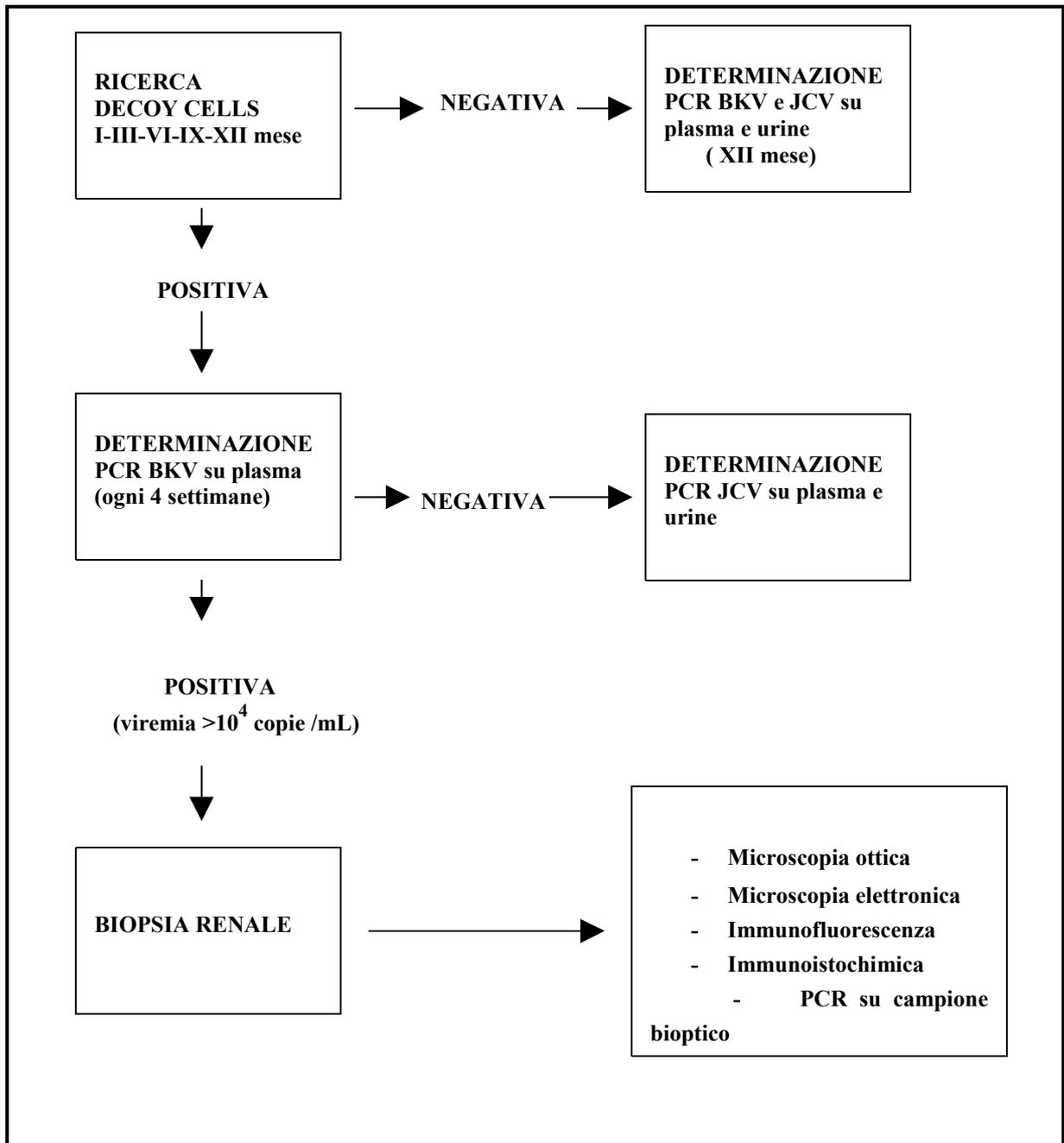


FIGURA 1. Algoritmo diagnostico utilizzato

1.2 Citologia urinaria

La metodica utilizzata presso l' Istituto di Anatomia Patologica del policlinico S. Orsola Malpighi, prevede la filtrazione senza centrifugazione del campione di urine. In questo modo è possibile recuperare ed analizzare tutte le cellule presenti nelle urine raccolte dal paziente. Il materiale ottenuto viene successivamente colorato con il metodo di Papanicolau ed osservato al microscopio ottico.

La possibilità di analizzare contestualmente tutto lo spettro di cellule eventualmente presenti nel campione, aiuta l' orientamento diagnostico.

Le cellule osservate non vengono quantificate secondo un criterio predefinito ma viene fornita una valutazione descrittiva della quantità di cellule osservate.

1.3 PCR

Le determinazioni PCR sono state eseguite presso l'Istituto di Microbiologia del policlinico S. Orsola Malpighi utilizzando le seguenti tecniche.

Per estrarre il DNA e l'RNA virale dai fluidi non cellulari, è stato utilizzato il prodotto «EXTRAGEN®», un sistema di estrazione del DNA e dell'RNA virale contenuto nelle particelle virali libere presenti in campioni di fluidi non cellulari quali plasma raccolto in EDTA, siero, liquido cefalorachidiano, liquido amniotico, urine, sovrinatante da gargarizzato, da tampone faringeo, da tampone nasale, da latte materno, da colture cellulari e da feci.

Il DNA e l'RNA possono essere utilizzati per saggi diagnostici basati su reazioni con gli enzimi DNA polimerasi (per esempio trascrittasi inversa e DNA polimerasi termostabili) come le reazioni di amplificazione degli acidi. Il prodotto «EXTRAGEN®» è una metodica di estrazione del DNA e dell'RNA con lisi in guanidina.

La procedura prevede quattro fasi operative:

- la lisi del campione (circa 15 minuti) nel reagente di estrazione con un agente caotropico(guanidina idrocloruro), un detergente (CTAB) e un agente riducente (2-mercaptoetanololo)
- la precipitazione ad alta temperatura delle proteine, la loro separazione per centrifugazione e la loro eliminazione (circa 30 minuti)
- la precipitazione degli acidi nucleici con etanolo e un coprecipitante inerte (poliacrilamide lineare) e il loro recupero per centrifugazione (circa 15 minuti)
- il lavaggio del deposito di acidi nucleici e il suo discioglimento nell'acqua ultrapura (circa 30 minuti)

Il prodotto «JCV / BKV oligomix Alert kit» è un saggio qualitativo di amplificazione degli acidi nucleici per la ricerca differenziale del DNA dei Polyomavirus umani JC e BK (JCV e BKV) in campioni di DNA estratto da plasma raccolto in EDTA e urine raccolte senza conservanti.

La procedura prevede l'esecuzione di due successive reazioni di coamplificazione (nested multiplex) con un termostato programmabile (thermal cycler).

Una prima reazione di amplificazione specifica per una regione del gene codificante il large T antigen di JCV e di BKV è condotta nella prima provetta (multiplex) partendo dal DNA estratto dai campioni in esame. Quindi una seconda reazione di amplificazione specifica per la regione del gene codificante il large T Antigen di JCV e di BKV è condotta nella seconda provetta (multiplex) partendo dal prodotto della prima reazione di amplificazione.

La presenza del prodotto specifico della seconda reazione di amplificazione indica la presenza del DNA di JCV e/o BKV nel campione di partenza.

Per quanto riguarda la quantificazione della carica virale con determinazione PCR quantitativa, le aliquote sono centrifugate e congelate a -20°C . Il DNA è stato estratto usando il Qiagen DNA kit. Per amplificare la regione del genoma codificante per la proteina VP1, sono stati utilizzati specifici primers oligonucleotidici.

La PCR è stata ottenuta usando i seguenti parametri:

5 minuti iniziali a 95° seguiti da 35 cicli di amplificazione consistenti in un minuto a 58°C , un minuto a 72° e un minuto a 95° seguiti da un ciclo di 7 minuti a 72° .

La presenza di 125 kbande indica la presenza di BKVDNA.

1.4 Biopsia

Due frustoli di parenchima, contenenti sia corticale che midollare, sono stati prelevati con un ago di 14 G.

Il campione è stato poi osservato alla microscopia ottica, elettronica e all'immunofluorescenza. In caso di diagnosi istologica dubbia, l'amplificazione del DNA virale sul campione bioptico e l'immunoistochimica usando anticorpi diretti contro T-Ag di SV40 o contro VP1, hanno permesso di identificare la presenza del virus.

2. Analisi statistica

Attraverso un'analisi univariata è stato valutato quali, tra le variabili considerate per ciascun paziente, possono essere significativamente associate con la presenza di decoy cells urinarie.

Le differenze sono state valutate con il test del Chi Quadrato o il test di Fisher per le variabili categoriche (Tabella 2) e con il test t- student o il test di Wilcoxon per le variabili continue (Tabella 3).

Il test di Wilcoxon è stato scelto dopo aver verificato la normalità distributiva delle variabili con il test di Kolmogorov-Smirnov.

3. Risultati

Al termine del periodo di screening, 10 dei 70 pazienti hanno presentato decoy cells in almeno un' analisi citologica urinaria. In questo modo è stato possibile dividere i pazienti sottoposti a screening in due gruppi e calcolare l'incidenza delle decoy cells urinarie che è del 14,3%. (Tabella 1)

Il tempo medio di riscontro di decoy cells urinarie è stato di 4,5 mesi.

DECOY CELLS			
Positive (gruppo1)		Negative (gruppo2)	
Numero	%	Numero	%
10	14,3	60	85,7
Totale pazienti = 70			

TABELLA 1.

ANALISI UNIVARIATA

L'analisi statistica univariata ha evidenziato che esiste un'associazione statisticamente significativa ($p < 0,05$) tra l'escrezione di decoy cells e le seguenti variabili:

- Assenza di ciclosporina nel protocollo di terapia immunosoppressiva:
0% (Gruppo 1) vs 19% (Gruppo 2).
- Emoglobina media (g/dL) al XII mese :
 $12,3 \pm 1,4$ (Gruppo 1) vs $13,7 \pm 1,3$ (Gruppo 2).
- Proteinuria media (mg/dL) al III mese:
 $30,5 \pm 38,9$ (Gruppo 1) vs $10 \pm 22,9$ (Gruppo 2).

In un recente studio Yeo et al, hanno proposto di considerare statisticamente significativi valori di $p < 0,10$ al fine di identificare le variabili da includere nell'analisi multivariata finale. (41)

Adottando questo, anche se le nostre analisi non comprendono l'analisi multivariata, altre variabili (che considereremo ai limiti della significatività statistica) possono essere associate all'escrezione di decoy cells urinarie:

- Tacrolimus nel protocollo di terapia immunosoppressiva
90% (Gruppo 1) vs 58,3% (Gruppo 2).
- Età media al trapianto (anni):
 $56 \pm 9,8$ (Gruppo 1) vs $48,1 \pm 12,9$ (Gruppo 2)
- MDRD medio (ml/min) al III mese:
 $42,3 \pm 13,3$ (Gruppo 1) vs $51 \pm 14,7$ (Gruppo 2)

Anche se il gruppo di pazienti con decoy cells positive ha un'età dialitica decisamente superiore rispetto al gruppo con citologia urinaria negativa, non è stata osservata nessuna associazione statisticamente significativa.

Per quanto riguarda la valutazione della terapia immunosoppressiva, dal momento che lo schema terapeutico di tutti i pazienti prevedeva

l'utilizzo di steroidi, non è stato possibile valutare questa variabile (Tabella 2 e Tabella 3).

Variabile	Gruppo 1 (decoy cells positive)		Gruppo 2 (decoy cells negative)		P
	n. pazienti	%	n. pazienti	%	
Sesso maschile	6	60	43	28,3	N. S.
Diabete	0	0	9	15	N. S.
Donatore cadavere	9	90	56	93,3	N. S.
Tp IS pre-trapianto	3	30	16	26,7	N. S.
Ischemia fredda > 24 ore	0	0	2	3,3	N. S.
DGF	3	30	16	26,7	N. S.
Mismatches >4	0	0	5	8,3	N. S.
Infezione CMV	1	10	7	11,7	N. S.
Induzione	7	70	45	70	N. S.
• basiliximab	7	70	42	70	N. S.
• ATG	0	0	3	5	N. S.
Terapia					
• Ciclosporina	0	0	19	31,7	0,05
• Tacrolimus	9	90	35	58,3	0,07*
• Tacrolemia > 8 ng/mL	20	33,3	5	50	N. S.
• Tacrolimus e MMF	22	37,9	4	40	N. S.
• MMF	9	90	45	75	N. S.
• Sirolimus	0	0	2	3,3	N. S.
• Everolimus	0	0	3	5	N. S.
Rigetto acuto	1	10	5	8,3	N. S.
Terapia rigetto					
• Boli steroide	1	10	4	6,7	N. S.
• ATG	0	0	0	0	N. S.

TABELLA 2. Variabili categoriche. I valori indicati con * sono i valori considerati ai limiti della significatività statistica

	Gruppo 1 (decoy cells positive)	Gruppo 2 (decoy cells negative)	p
Età media al trapianto (anni)	56 ± 9,8	48.1 ± 12,9	0,07*
Età dialitica media al trapianto (mesi)	80,1 ± 59,3	57,4 ± 35	N. S.
Creatinina media (mg/dL)			

• I mese	1,57 ± 0,56	1,56 ± 0,53	N. S.
• III mese	1,75 ± 0,54	1,57 ± 0,47	N. S.
• VI mese	1,51 ± 0,31	1,61 ± 0,80	N. S.
• IX mese	1,45 ± 0,3	1,55 ± 1,1	N. S.
• XII mese	1,34 ± 0,27	1,33 ± 0,3	N. S.
MDRD (ml/min)			
• I mese	49,4 ± 18	53 ± 18,6	N. S.
• III mese	42,3 ± 13,3	51 ± 14,7	0,09*
• VI mese	54,9 ± 19,5	53,2 ± 19,3	N. S.
• IX mese	46,8 ± 13,5	55,8 ± 18,1	N. S.
• XII mese	47 ± 9,4	59,9±18,1	N. S.
Emoglobina media (g/dL)			
• I mese	11,2 ± 1,5	11,4 ± 1,3	N. S.
• III mese	12 ± 1,6	12,2 ± 1,3	N. S.
• VI mese	13,2 ± 1,4	12,8 ± 1,4	N. S.
• IX mese	12,6 ± 1,4	13,4 ± 1,5	N. S.
• XII mese	12,3± 1,4	13,7 ± 1,3	0,04
Numero medio leucociti			
• I mese	7714 ± 2185,3	7540,9 ± 2683,2	N. S.
• III mese	5570,6 ± 2963,9	6313 ,6 ± 1853,4	N. S.
• VI mese	6602,5 ± 2019,6	6869 ± 2807,4	N. S.
• IX mese	4592 ± 2270,6	6398,4 ± 1851,5	N. S.
• XII mese	6855 ± 2354,1	6782,9 ± 1566,1	N. S.
Proteinuria media (mg/dL)			
• I mese	27,5 ± 39,4	36,7 ± 130	N. S.
• III mese	30,5 ± 38,9	10 ± 22,9	0,03
• VI mese	13,1 ± 12,5	9,1 ± 20,8	N. S.
• IX mese	28 ± 42	36,2 ± 161,8	N. S.
• XII mese	8,7 ± 14,3	16,2 ± 31,9	N. S.

TABELLA 3. Variabili continue I valori indicati con * sono i valori considerati ai limiti della significatività statistica

Seguendo l'algoritmo, lo step successivo è stato quello di dosare nel sangue la carica virale del BKV mediante PCR nel gruppo di pazienti con decoy cell positive. Tali determinazioni PCR su plasma per BKV hanno permesso di individuare 3 pazienti con viremia attiva (BK DNAemia).

TABELLA 4.

L'incidenza calcolata dell'infezione attiva da BKV sul totale dei pazienti nella nostra casistica, è del 4,3%, mentre l'incidenza di viremia nei pazienti con decoy cells positive è del 30 % (Tabella 4).

Nel caso dei nostri tre pazienti, i valori di viremia superavano i livelli indicati dalla letteratura come cut-off per formulare una diagnosi di nefropatia da BK presuntiva e collocavano i pazienti nel gruppo ad

PCR BKV DNA (plasma)			
Positiva		Negativa	
Numero	%	Numero	%
3	30	7	70
Totale pazienti = 10			

elevato rischio.

Il valore medio di viremia calcolato è di 10220 copie/ ml.

Tali dati hanno reso necessaria l'esecuzione di una biopsia renale.

L'analisi istologica, immunoistochimica e la ricerca di DNA virale sul campione biptico, hanno permesso di confermare la diagnosi di nefropatia, la cui incidenza è stata, nella nostra casistica, del 4,3%.

Il tempo di diagnosi media di nefropatia da BKV, calcolato nella nostra casistica, è di 4,2 mesi.

Al momento della diagnosi di BKVN, due dei pazienti presentavano valori di creatininemia nella norma, mentre in un terzo l'infezione si è presentata con un quadro di insufficienza renale acuta con valori di creatinemia fino a 7 mg/dL.

Nell'unico caso in cui la nefropatia si era presentata con un rialzo degli indici di funzionalità renale, i valori di creatinina sono andati progressivamente diminuendo dopo il trattamento.

Per tutti i pazienti, si è potuto osservare che la carica virale si è progressivamente ridotta dopo l'adozione di un provvedimento terapeutico e, parallelamente, si è assistito alla scomparsa delle decoy cells nelle urine (Tabella 5 e Figura 1).

	I PCR (copie/ml)	II PCR (copie/ml)	III PCR (copie/ml)	IV PCR (copie/ml)	V PCR (copie/ml)	VI PCR (copie/ml)	VII PCR (copie/ml)
S.A.	0	1763	1700	1783	11150	450	278
B.E.	36648	48748	101241	75507	10841		
Z.A.	3176	24018	1511	316			

TABELLA 5. Quantificazione della carica virale nel tempo nei pazienti con diagnosi di BKVN.

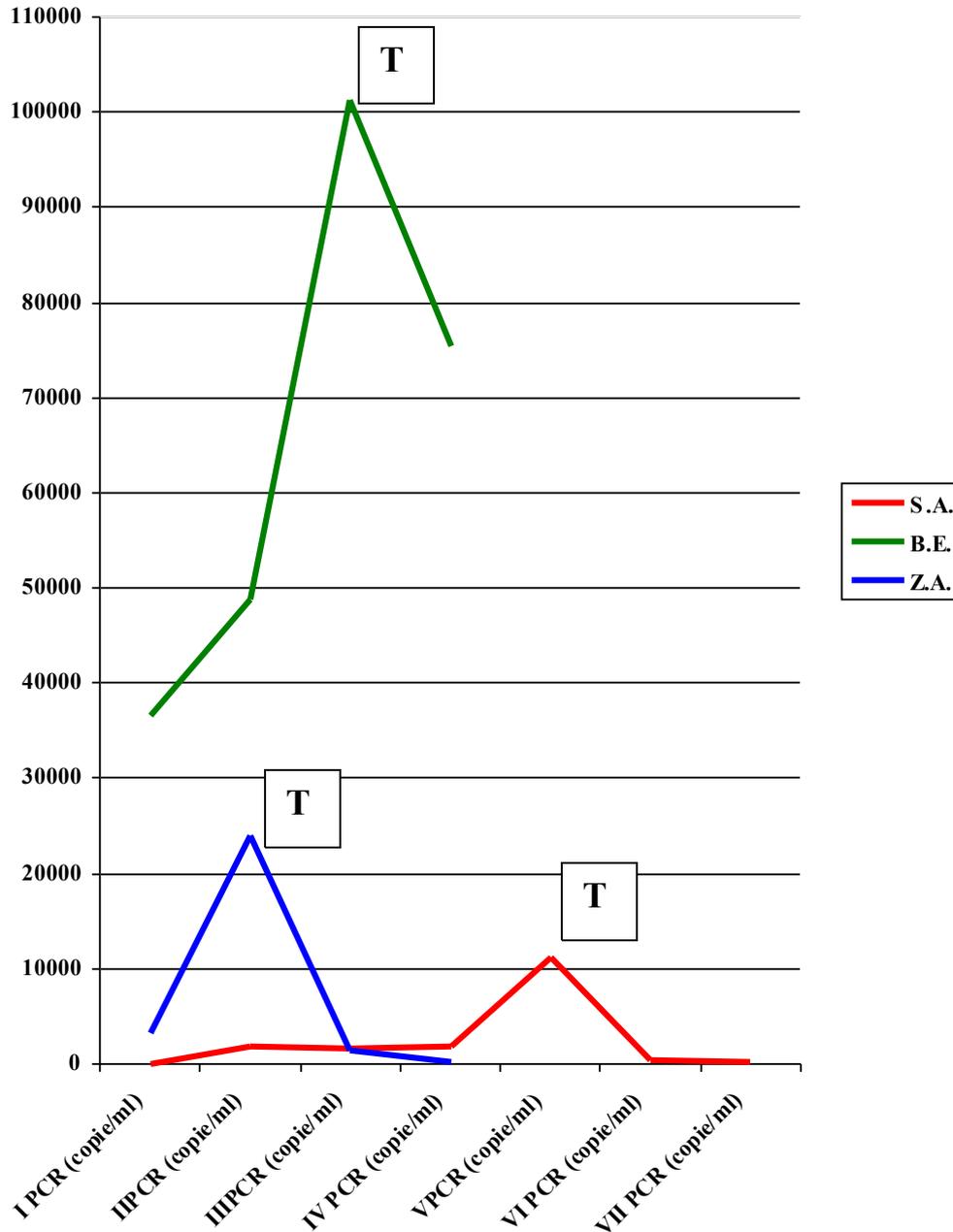


FIGURA 1. Andamento della carica virale nei pazienti quantificata con determinazioni PCR.

“T” indica il momento in cui è stato adottato un provvedimento terapeutico

Su campioni di sangue e urine dei 7 pazienti con persistenza di decoy cells urinarie, in assenza di BK DNAemia, è stata quindi eseguita la

determinazione qualitativa per JCV che ha evidenziato la presenza del

PCR JCV DNA (urine)			
Positiva		Negativa	
Numero	%	Numero	%
7	100	0	0
PCR JCV DNA (plasma)			
Positiva		Negativa	
Numero	%	Numero	%
0	0	10	100
Totale pazienti = 7			

virus nelle urine in assenza di viremia nel plasma.

La metodica utilizzata ha permesso inoltre di valutare l'assenza di BKV nelle urine di questi pazienti

TABELLA 6.

L'incidenza di viruria per JCV calcolata nella nostra casistica sul totale dei nostri pazienti è del 10%, mentre l'incidenza di viruria nei pazienti con decoy cells positive in assenza di BKV DNA nel sangue è del 100% (Tabella 6).

Infine, al termine del primo anno post-trapianto, è stata effettuata la determinazione PCR per BKV e JCV sul plasma e urine, nei pazienti con citologia urinaria negativa. I risultati preliminari mostrano l'assenza di DNA virale per entrambi i virus.

Tra i 70 pazienti presi in considerazione nello studio, tre hanno perso il trapianto, riprendendo di conseguenza il trattamento dialitico. In nessuno di questi casi, l'analisi citologica ha dimostrato la presenza di decoy cells urinarie e le indagini molecolari e istologiche condotte su questi pazienti hanno permesso di escludere che la causa della perdita del trapianto fosse una nefropatia da BKV.

Discussione

L' infezione da Polyomavirus, soprattutto Polyomavirus BK può essere considerata una delle più insidiose complicanze infettive per i pazienti sottoposti a trapianto renale.

Nonostante questi virus siano conosciuti sin dagli anni '70, è stato soprattutto negli ultimi dieci anni che si è acquistata la consapevolezza delle drammatiche implicazioni che questa infezione può avere sulla prognosi del trapianto.

L' infezione attiva può essere causa di una stenosi ureterale o, molto più frequentemente, di una nefropatia interstiziale (BKVN) caratterizzata da un grado variabile di infiammazione atrofia tubulare e fibrosi a seconda dello stadio.

La prevalenza della nefropatia, nella maggioranza dei casi dovuta a Polyomavirus BK, varia dall'1 al 10% a seconda delle casistiche (25), con una prognosi decisamente sfavorevole.

I dati della letteratura riportano infatti che quasi la metà dei pazienti (45%) a cui è stata diagnosticata una nefropatia da BKV, va incontro ad un progressivo e irreversibile peggioramento della funzione renale fino ad arrivare ad uno stadio di insufficienza renale terminale. (9, 19)

La diagnosi di nefropatia viene in genere formulata dopo l'analisi istologica di un campione bioptico talora supportata da un' analisi immunoistochimica e dall' amplificazione del DNA virale sul tessuto.

Altre metodiche diagnostiche quali l'analisi citologica urinaria e la determinazione PCR su sangue e urine per quantificare la carica virale, possono essere impiegate per sostituire o integrare la diagnosi istologica offrendo, come nel caso della citologia urinaria, l'ulteriore vantaggio di individuare la replicazione virale in fase attiva, prima ancora della comparsa delle lesioni istologiche. (19)

Se da una parte l'intensa attività di ricerca cui numerosi centri si sono dedicati ha permesso di chiarire alcuni aspetti di questa problematica,

dall'altra lascia ancora alcuni interrogativi irrisolti, soprattutto in termini di prevenzione e di terapia.

Alcuni farmaci quali il cidofovir, la leflunomide, i fluorochinolonici e la immunoglobuline sono stati proposti per il trattamento della nefropatia ma mancano ancora studi randomizzati e controllati che confermino la loro reale efficacia. (25, 29,89)

Attualmente, l'unica strategia terapeutica sulla cui efficacia concorda la totalità degli autori consiste in una riduzione della terapia immunosoppressiva. (25, 29) Dati i non trascurabili rischi che questo provvedimento comporta (rigetto acuto e conseguente rischio di perdita del graft), si comprende l'importanza di avere a disposizione una metodica di screening applicabile su larga scala che possa consentire di individuare i pazienti a rischio di sviluppare una nefropatia da Polyomavirus.

Dopo una revisione della letteratura, i risultati ottenuti ci fanno ritenere che l'algoritmo utilizzato è stato di fondamentale utilità per la diagnosi precoce di nefropatia da BKV.

Pertanto la citologia urinaria con valutazione delle decoy cells risulta altamente proponibile come screening alla luce delle seguenti considerazioni.

1. La sensibilità della citologia urinaria è vicina al 100%. (37, 38, 45, 46)
2. La citologia urinaria è un test economico, routinario e non invasivo.
3. Le decoy cells possono essere considerate markers precoci di riattivazione virale al pari della determinazione PCR sulle urine dei pazienti, permettendo in questi casi di individuare tempestivamente i pazienti con infezione attiva e che quindi devono essere considerati pazienti a rischio di nefropatia. (19, 39, 40, 41, 42, 43)

I risultati ottenuti dal presente studio hanno evidenziato un' incidenza di decoy cells urinarie del 14,3 %.

L'incidenza di viremia attiva per BKV è stata del 4,3%, con un valore medio di 10220 copie/ ml.

L'incidenza di nefropatia da BKV è stata anch'essa del 4,3%.

Tuttavia è necessario sottolineare che la quantificazione della carica virale urinaria rischia, in alcuni casi, di essere fuorviante dal momento che la clearance del DNA virale dalle urine è molto lenta e a volte incompleta anche se la replicazione si è arrestata. (19)

Dal momento che caratteristicamente l' infezione procede in modo graduale e che la diffusione del virus a livello sistemico ed il successivo interessamento parenchimale renale si osservano nelle fasi più avanzate di progressione, metodiche più specifiche come la determinazione PCR su sangue o la biopsia renale possono non rivelarsi altrettanto sensibili nelle prime fasi di riattivazione virale e devono essere adottate solo in un secondo momento a supporto e completamento del processo diagnostico. (19)

In nessun caso è stata evidenziata una viremia attiva per JCV mentre l'incidenza di viruria per JCV sul totale dei pazienti è stata del 10% .

I risultati ottenuti al termine dello studio ci hanno permesso di confermare l'elevata sensibilità della citologia urinaria. In tutti i casi in cui sono state osservate decoy cells urinarie è stata infatti dimostrata la presenza di DNA virale di BKV o di JCV rispettivamente nel sangue e nelle urine dei pazienti. Inoltre i risultati preliminari delle determinazioni PCR di controllo per BKV e JCV su sangue e urine del gruppo con citologia urinaria negativa, non hanno in nessun caso evidenziato infezioni attive sconosciute.

Essendo le decoy cells urinarie un markers precoce di riattivazione virale, abbiamo ricercato, attraverso un' analisi statistica univariata, una possibile associazione tra l'escrezione urinaria di decoy cells e alcune variabili scelte sulla base dei fattori di rischio indicati dalla

letteratura. I risultati ottenuti ricalcano i dati riportati in letteratura, sottolineando l'importanza della terapia immunosoppressiva nel determinare la riattivazione virale.

E' stato infatti osservato che esiste un' associazione statisticamente significativa tra l'adozione di tacrolimus e l' escrezione urinaria di decoy cells. Tale risultato è stato successivamente messo a confronto con i dati riguardanti la terapia con ciclosporina portando a concludere che, sulla base dei dati da noi raccolti, la terapia con tacrolimus invece che con ciclosporina è associato alla comparsa di decoy cells.

Anche la correlazione con l'età del paziente al trapianto è già stata evidenziata in letteratura. Hirsch et al infatti, riportano l'età come fattore di rischio, suggerendo che la risposta immunosoppressiva a seguito della terapia antirigetto, a parità di dosi di farmaco, aumenta con l'aumentare dell'età. (9, 90, 91)

Le associazioni tra i valori di proteinuria, di emoglobina e GFR calcolato con MDRD e le decoy cells, riscontrata nel nostro studio non sono in genere menzionate dalla letteratura e richiedono di essere approfondite potendo offrire nuovi spunti di ricerca. Si potrebbe ipotizzare che alterazioni renali precoci possano essere correlate con un "ambiente" facilitante la replicazione virale.

Durante la seconda fase dello studio le indagini molecolari e istologiche effettuate sul gruppo di pazienti a rischio ci hanno permesso di osservare un' incidenza di nefropatia sovrapponibile a quella riportata dalla letteratura.

Nei pazienti con nefropatia è stata in primo luogo ridotta la terapia immunosoppressiva e solo in un caso, data l'elevata carica virale nel plasma e il rialzo della creatinina, si è optato per il trattamento con leflunomide dopo aver somministrato, in una prima fase, anche fluorochinolonici (moxifloxacina) e immunoglobuline.

A seguito dei provvedimenti terapeutici, in tutti i pazienti si è osservata una riduzione della carica virale in assenza di eliminazione di decoy cells urinarie (Tabella 5). Tali dati indicano che è cessata la

replicazione virale attiva e che la nefropatia si sta avviando verso un processo di risoluzione.(19)

Dobbiamo inoltre sottolineare che in due dei tre casi osservati nella nostra casistica, la diagnosi è stata formulata prima del rialzo dei valori di creatininemia permettendo in questo modo di intervenire precocemente e di arrestare la progressione dell'infezione.

Nel nostro studio, il percorso diagnostico applicato ha quindi permesso di identificare precocemente i pazienti a rischio di sviluppare l'infezione da Polyomavirus, che, come già sottolineato, costituisce una reale minaccia per la sopravvivenza del graft.

Tale percorso diagnostico appare utile soprattutto se consideriamo che allo stato attuale la possibilità di giungere ad una diagnosi precoce resta l'unico reale strumento a nostra disposizione. Al contrario di quanto accade con altre infezioni virali, non è possibile nel caso del Polyomavirus individuare i pazienti portatori del virus prima o immediatamente dopo il trapianto attraverso la sierologia. Il limite di questo approccio risiede soprattutto nel fatto che la maggioranza degli individui è già entrata in contatto con il virus nell'età adulta e risulta perciò sieropositiva. Inoltre, non esiste una terapia di profilassi codificata.

La frequenza con cui lo screening deve essere applicato deve essere almeno trimestrale e continuativa per i primi due anni post-trapianto. Non dobbiamo però dimenticare che, nonostante l'incidenza della nefropatia sia massima in questo periodo, sono stati documentati alcuni casi di BKVN presentatisi a distanza di alcuni anni dal trapianto. Per questa ragione, ogni qualvolta si sospetti uno stato di eccessiva immunosoppressione del paziente o in caso di un rialzo degli indici di funzionalità renale, è indicata la ricerca delle decoy cells urinarie per escludere un eventuale coinvolgimento di Polyomavirus. (19,92, 93)

Per quanto riguarda il follow-up a lungo termine dei pazienti in cui è stata osservata una replicazione virale attiva, viene raccomandato in letteratura di continuare ad effettuare controlli ravvicinati ogni quattro settimane.

Resta infine da considerare come monitorare e gestire il trattamento antivirale.

Mentre la riduzione della terapia immunosoppressiva, se possibile, deve essere considerata un provvedimento definitivo, il trattamento con specifici farmaci antivirali (nel nostro caso Leflunomide) deve essere prolungato fino a che non è possibile osservare la clearance del virus nel plasma, che in genere avviene entro 12-24 settimane.

Qualora la carica virale dovesse persistere anche dopo questo periodo è possibile comunque continuare il trattamento o eventualmente modificare il tipo di farmaco adottato. La persistenza di un' elevata carica virale anche dopo diverse settimane di trattamento deve comunque essere considerato un fattore prognostico negativo.

Durante gli ultimi dieci anni, molti progressi sono stati fatti a proposito delle caratteristiche e della gestione clinica dell' infezione da Polyomavirus nei pazienti sottoposti a trapianto renale.

Alcune questioni restano tuttavia ancora aperte soprattutto per quanto riguarda la determinazione dei fattori di rischio, lo sviluppo di efficaci strategie preventive e l' individuazione di un trattamento sicuro ed efficace. Una volta che tali obiettivi saranno raggiunti sarà finalmente possibile "spodestare" l' infezione da Polyomavirus dal ruolo di primo piano che attualmente ricopre tra le complicanze infettive post-trapianto renale.

Bibliografia

1. A. Egli, S. Binggeli, S. Bodaghi et al. Cytomegalovirus and polyomavirus posttransplant. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22 [Suppl 8]: 72-82.
2. J. A. Fishman. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med* 2007; 357: 2601-2614.
3. C. N. Kotton, J.A. Fishman. Viral infection in the renal transplants recipients. *J Am Nephrol* 2005; 16: 1758-1774.
4. J. A. Fishman. Infection in renal transplants recipients. *Seminars in Nephrology* 2007; Vol 27, No 4: 445-461.
5. S. D. Gardner, A. M. Field, D. V. Coleman, B. Hulme. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after kidney transplantation. *Lancet* 1971; 1: 1253-1257.
6. B. L. Padgett, D. L. Walker, G. M. Zhu Rein et al. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* 1971; 1: 1257-1260.
7. S. D. Gardner, E. F. D. Mackenzie, C. Smith, A. A. Porter. Prospective study of the human polyomaviruses BK and JC and cytomegalovirus in renal transplant recipients. *J. Clin Pathol* 1984; 37: 578-586.
8. Index of Viruses - Polyomaviridae (2006). In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C (Ed), Columbia University, New York, USA.

9. H. H. Hirsch, J. Steiger. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 611-623.
10. H. Z. Hausen. Novel human polyomaviruses-re-emergence of a well known virus family as possible human carcinogens. *Int. J. Cancer* 2008; 123: 247-250.
11. R. M. Li, R. B. Mannon, D. Kleiner et al. BK virus and SV-40 co-infection in polyomavirus nephropathy. *Transplantation* 2002; Vol 74 No 11: 1497-1504.
12. A. S. Dugan, S. Eash, W. J. Atwood. Update of BK virus entry and intracellular trafficking” *A Transpl Infect Dis* 2006; 8: 62-67.
13. M. Jiang, J. R. Abend, S. F. Johnson, M. J. Imperiale. Role of polyomaviruses in human disease. *Virology* 2009; 384: 266-273.
14. H. Y. Zheng, Y. Nishimoto, Q. Chen et al. Relationships between BK virus lineages and human populations. *Microbes and Infection* 2007; 9: 204-213.
15. A. S. Khaled. Polyomavirus (BK virus) in kidney transplants patients: a pathologic perspective. *Yonsei Med J* 2004; Vol 45 No 6: 1065-1075.
16. S. E. Pressor, R. J. Orentas, J. Rimas et al. Recovery of BK virus large T-Antigen-specific cellular immune response correlates with resolution of BK virus nephritis. *Transplantation* 2008; Vol 85 (2): 185-192.
17. P. S. Randhawa, I. Popescu, C. Macedo et al. Detection of CD8+ T cells sensitized to BK Virus large T-Antigen in healthy

volunteers and kidney transplant recipients” S. Parmjeet , Human Immunology 2006; 67: 298-302.

18. S. Eash, K. Manley, M. Gasparovic et al. The human polyomaviruses. Cell. Mol. Life Sci. 2006; 63: 865-876.
19. V. Nickeleit, M. Miahtsch. Polyomavirus nephropathy in native kidneys and renal allograft: an update on an escalating treat. Transplant international 2006; 19: 960-963.
20. G. V. Gee, A. S. Dugan, N. Tsomaia et al. The role of sialic acid in human polyomavirus infection. Glycoconj J 2006; 23: 19-26.
21. T. Moryama, J. P. Marquez, T. Wakatsuki, A. Sorokin. Caveolar endocytosis is critical for BK Virus Infection of human renal proximal tubular epithelial cells. Journal of Virology 2007; Vol 81 No 16: 8852-8562.
22. C. B. Drachemberg, H. H. Hirsch, E. Ramos, J. C. Papadimitriou. Polyomavirus disease in renal transplantation. Review of pathological findings and diagnostic methods. Human Pathology 2005; 36: 1245-1255.
23. K. E. Doucette, X. L. Pang, K. Jackson et al. Prospective monitoring of BK polyomavirus infection early post-transplantation in nonrenal solid organ transplant recipients. Transplantation 2008; Vol 85 No 12: 1733-1736.
24. L. R. Lard., P. J. M. Van der Boo, M. Vasevic et al. A pitfall in screening with decoy cells after simultaneous pancreas kidney transplantation. Clin Transplant 2008; 22:833-836.

25. E. Ramos, C. B. Drachemberg, R. Wali, H. H. Hirsch. The decade of polyomavirus BK-associated nephropaty: state of affairs. *Transplantation* 2009; 87: 621-630.
26. H. H. Hirsch, D. C. Brennan, C. B. Drachemberg. Polyomavirus associated nephropaty: interdisciplinary analisys and raccomandations. *Transplantation* 2005; 79: 1277-1286.
27. P. S. Randahawa, A. J. Demetris. Nephropaty due to Polyomavirus type BK. *N Engl J Med* 2000; 342: 1361-1363.
28. M. Koukoulaki, E. Grispou, D. Pistolas et al. Prospective monitoring of BK virus replication in renal transplant recipients. *Transplant Infect Dis* 2008; 11: 1-10.
29. C. Bonvoisin, L. Weekers, P. Xhigresse et al. Polyomavirus in renal transplantation: a hot problem. *Transplantation* 2008; 85[S7]: 42-42.
30. H. H. Hirsch, W. Knowles, M. Dickenmann et al. Prospective study of Polyomavirus type BK replication and nephropaty in renal transplant recipients. *N Engl J Med* 2002; Vol 347 No 7: 488-496.
31. C. Bressolet-Bodin, M. Coste-Burel, M. Hourmant et al. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *American Journal of transplantation* 2005; 5: 1926-1933.
32. D. L. Bhol, G. A. Storch, C. Ryschkewitsch et al. Donor origin of BK virus in renal transplantation and role of HLAC7 in susceptibility to substained BK viremia. *American journal of transplantation* 2005; 5: 2213-2221.

33. O. Prince, S. Savic, M. Dickenmann et al. Risk factor for polyomavirus nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 1024-1033.
34. V. R. Dharnidharka, W. S. Cherikh, K. C. Abbott. An OPTN analysis of national registry data on treatment of BK virus allograft nephropathy in the United States. *Transplantation* 2009; 87: 1019-1026.
35. J. Beimler, C. Sommerer, M. Zeier. The influence of the immunosuppression on the development of BK virus nephropathy- does it matter? *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22 [S8]: 66-71.
36. L. H. White, A. Casian, R. Hilton et al. BK virus nephropathy in renal transplants patients in London. *Transplantation* 2008; 85: 1008-1015.
37. R. L. S. Santos, J. A. Manfrinatto, E. M. M. Cia et al. Urine cytology as screening method for Polyomavirus active infection. *Transplantation proceedings* 2004; 36: 899-901.
38. B. Gheramizadeh, J. Roozbeh, S. A. Hosseini et al. Urine cytology as a useful screening method for Polyomavirus nephropathy in renal transplant patients: a single center experience., *Transplantation proceedings* 2006; 38: 2923-2925.
39. T. P. Thamboo, K. J. Jeffrey, P. J. Friend et al. Urine cytology screening for Polyomavirus infection following renal transplantation: the Oxford experience. *J Clin Pathol* 2007; 60: 927-930.

40. C. Costa, M. Bergallo, S. Astegiano et al. Monitoring of BK virus replication in the first year following renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2008 ; 10: 333-336.
41. F. E. Yeo, C. M. Yuan, S. J. Swanson et al. The prevalence of BK polyomavirus infection in outpatient kidney transplant recipients followed in a single center. *Clin Transplant* 2008; 22: 532-541.
42. K. Kapila, M. R. N. Nampoory, K. V. Jhony et al. Role of urine cytology in detecting human polyoma BK virus in kidney transplant recipients. *Med Princ Pract* 2007; 16: 237-239.
43. M. Gai, G. Lanfranco, G. P. Segoloni. Decoy cells in urine. *Transplantation proceedings* 2005; 37: 4309-4310.
44. A. Hayat, R. Mukhopadhyay, S. Radhika et al. Adverse impact of pretransplant polyomavirus infection on renal allograft function. *Nephrology* 2008; 13: 157-163.
45. V. Nickeleit, H. H. Hirsch, I. F. Binet. Polyomavirus infection of renal allograft recipients. From latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1080-1089.
46. M. Koukoulaki, M. O'Donovan, S. Pursglove et al. Prospective study of urine cytology screening for BK polyomavirus replication in renal transplant recipients. *Cytopathology* 2008; 385-388.
47. P. S. Randhawa, G. Gupta, A. Vats et al. Immunoglobulin G, A and M responses to BK virus in renal transplantation. *Clin. Vaccine Immunol.* 2006; Vol 13 No 9: 1057-1063.
48. P. Comoli, A. Azzi, R. Maccario et al. Polyomavirus BK specific immunity after kidney transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 1229-1232.

49. C. B. Drachemberg, J.C. Papadimitriou. Polyomavirus associated nephropaty, update in diagnosis. *Transpl Infect Dis* 2006; 8: 68-75.
50. C. Merlini, M. Bergallo, G. gribaudo et al. Polyoma BK DNA quantification assay to evaluate viral load in renal transplant recipients. *Journal of clinical virology* 2003; 28: 265-274.
51. G. A. Funk, R. Gosert, P. Comoli et al. Polyomavirus BK replication dynamics in vivo and in silico to predict citopathology and viral clearence in kidney transplants. *American Journal of Transplantation* 2008; 8: 2368-2377.
52. E. Bracamonte, N. Leca, K. D. Smith et al. Tubular basement membrane immune deposits in association with BK Polyomavirus nephropaty. *American Journal of Transplantation* 2007; 7: 1552-1560.
53. P. S. Randahawa, S. Finkelstein, V. Scantlebury et al. Human Polyomavirus associated interstitiial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation* 1999; 67: 103-109.
54. V. Nickeleit, H. H. Hirsch, M. Zeler et al. BK virus nephropaty in renal transplants-tubular necrosis, MHC-classII and rejection in a puzzling game. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 324-332.
55. C. B. Drachemberg, J. C. Papadimitriou, E. Ramos. Histological versus molecolar diagnosis of BK Polyomavirus-associated nephropaty: a shifting paradigm? *Clin J Am Soc Nephrol*, 2006; 1: 374-379.

56. I. Batal, A. Zevi, A. Heider et al. Measurements of global cell mediated immunity in renal transplants recipients with BKV virus reactivation. *Am J Clin Pathol* 2008; 129: 587-591.
57. P. Comoli, S. Binggeli, F. Ginevri, H. H. Hirsch. Polyomavirus-associated nephropathy: update on BK virus-specific immunity. *Transpl Infect Dis* 2006; 8: 86-94.
58. Y. Chen, J. Trofe, J. Gordon et al. Interplay of cellular and humoral immune responses against BKV virus in kidney transplant recipients with polyomavirus nephropathy. *Journal of Virology* 2006; Vol 80 No 7: 3495-3505.
59. B. Vasudev, S. Haiharan, S. Hussain et al. BK virus nephritis: risk factors, timing and outcome in renal transplant recipients. *Kidney International* 2005;68: 1834-1839.
60. C. Almeras, V. Foulogne, V. Garrigue. Does reduction in immunosuppression in viremic patients prevents virus nephropathy in de novo transplant recipients? a prospective study. *Clinical Transplantation* 2008; 85: 1099-1104.
61. S. Ehab, B. Bresnan, E. P. Cohen. Successful treatment of BK viremia using reduction in immunosuppression without antiviral therapy. *Transplantation* 2008; 85: 850-854.
62. P. Randhawa, C. B. Brennan. BK Virus infection in renal transplant recipients: an overview and update. *American Journal of Transplantation* 2006; 6: 2000-2005.
63. P. S. Randhawa, J. Zemlicka, A. Saubrei et al. Anti-BK virus activity of nucleoside analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; Vol 52 No 15: 1519-1521.

64. M. A. Josephson , D. Gillen, B. Javaid et al. Treatment of renal allograft Polyomavirus BK infection with leflunomide. *Transplantation* 2006; 81: 704-710.
65. N. A. Farasati, R. Shapiro, A. Vats, P. Randhawa. Effect of Leflunomide and Cidofovir of BK virus in an in vitro culture system. *Transplantation* 2005;79: 116-118.
66. M. Koukoulaki, T. Apostolou, V. Hadjiconstantinou, S. Dracoupolos. Impact of prophylactic administration of ciprofloxacin on BK polyomavirus replication. *Transpl Infect Dis* 2008; 10: 449-451.
67. A. Y. H. Leung, M. T. L. Chan, K. Y. Yuen et al. Ciprofloxacin decreased polyoma BK virus load in patients who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *CID* 2005; 40: 528-537.
68. R. Hilton, C. Y. William Tong. Antiviral therapy for polyomavirus nephropathy after renal transplantation. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 855-859.
69. J. A. Fishman. BK virus nephropathy: what is the role of antiviral therapy? *American Journal of Transplantation* 2003; 3: 99-100.
70. S. Faguer, H. H. Hirsch, N. Kamar et al. Leflunomide treatment for Polyomavirus BK associated nephropathy after kidney transplantation. *Transpl Int* 2007; 20: 962-969.
71. T. Moriyama, A. Sorokin. Repression of BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cell by pravastatin. *Transplantation* 2008; 85: 1311-1317.

72. P. Acott, P. O' Regan, J. F. S. Crocker. Suppression of early and chronic BK Polyomavirus replication by Mycophenolic acid in Vero cells. *Transpl Int* 2009; 22: 225- 231.
73. P. Acott, P. A. O' Regan, S. H. Lee, J. F. S. Crocker. In vitro effect of ciclosporina A on primary and chronic BK polyomavirus infection in Vero E6 cells. *Transpl Inf Dis* 2008; 10: 385-390.
74. L. K. Kayaler, I. Batal, R. Mohanka et al. Antirjection treatment in kidney transplant patients with BK viruria. *Transplantation*, 2008; 86: 797-803
75. S. Hariharan. BK virus nephritis after renal transplantation. *Kidney international* 2006; 69: 655-662.
76. D. L. Bohl, D. C. Brennan. BK virus nephropaty and kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2: 36-46.
77. J. R. Abend, M. Jiang, M. J. Imperiale. BK virus and human cancer: innocent until proven guilty. *Seminars in cancer biology* 2009; 19: 252-260.
78. M. K. White, J. Gordon, K. Reiss et al. Human polyomaviruses and brain tumors. *Brain research rewiews* 2005; 50: 69-85.
79. A. Vats. BK virus and neoplasia: an emerging role. *Pediatr Transplantation* 2008; 12: 499-502.
80. P. S. Randhawa, F. Baksh, N. Aoki et al. JC virus infection in allograft kidneys. *Tranplantation* 2001; Vol 71 No 9: 1300-1303.

81. A. Kazory, D. Doucloux, J. M. Chalopin. The first case of JCV allograft nephropaty. *Tranplantation* 2001; Vol 76 No 11: 1653-1654.
82. M. C. Wen, C. L. Wang, M. Wang et al. Association of JCV with tubulointerstitial nephritis in a renal allograft recipient. *J Med Vir* 2004; 72: 675-678.
83. A. Rossi, S. Delbue, R. Mazziotti et al. Presence, quantitation and characterization of JC virus in the urine of italian immunocompetent subjects. *J. Med. Virol* 2007; 79: 408-412.
84. P. S. Randhawa, J. Uhrmacher, W. Pasculle et al. A comparative study of BK and JC virus infections in organ transplant recipients. *J. Med. Virol* 2005; 77: 238-243.
85. C. Costa, M. Bergallo, F. Sidoti et al. Polyomaviruses BK and JC DNA quantitation in kidney allograft biopsies, *J Clin Virol* 2009; 44: 20-23.
86. C. B. Drachemberg, H. H. Hirsch, J. C. Papadimitriou. Polyomavirus BK versus JC replication and nephropaty in renal transplant recipients: a prospective evaluation. *Transplantation* 2008; 84: 323-330.
87. J. A. Fishman. BK virus nephropaty- Polyomavirus adding insult to injury. *N Engl J Med* 2002; Vol 347 No 7: 527- 530.
88. R. T. Neff, F. P. Hurst, E. M. Falta et al. Progressive multifocal leucoencephalopathy and use of mycophenolate mofetil after kidney transplantation. *Transplantation* 2008; 86: 1474-1478.

89. C. Canivet, L. Roastaing, S. Galvani et al. Polyoma BK virus-associated nephropathy in kidney-transplant patients: Effects of leflunomide on T-cell functions and disease outcome. *Int immunopharmacol* 2009.
90. J. Gralla, A. C. Wiseman. Tacrolimus/Sirolimus versus Tacrolimus/Mycophenolate in kidney transplantation: improved 3-year graft and patient survival in recent era. *Transplantation* 2007; 87: 1712-1719.
91. A. Sessa, A. Esposito, A. Gilberti et al. BKV reactivation in renal transplants recipients: diagnostic and therapeutic strategy-case report. *Transplantation proceeding* 2008; 40: 2055-2058.
92. S. Bansal, M. S. Lucia, A. Wiseman. A case of Polyomavirus nephropaty presentig later after tranplantation. *Nature clinical practice* 2008; Vol 4 No5: 283-287.
93. A. C. Wiseman. Polyomavirus nephropaty: a current perspective and clinical consideration. *Am J Kidney Dis* 2009; 54:131-142.