АКТИВНОСТ НА ЧОВЕШКИЯ ПОЛИОМЕН ВИРУС BK ПРИ БЪБРЕЧНОТРАНСПЛАНТИРАНИ ПАЦИЕНТИ

Зл. Кълвачев[1], Ил. Цеков[1], В. Владимиров[2], Е. Паскалев[3], Б. Златков[3], Ж. Филипов[3] и М. Гичева[4]

[1]Лаборатория по молекулярна вирусология, Военномедицинска академия – София
[2]Клиника по урология, УМБАЛ „Александровска" – София
[3]Клиника по нефрология и трансплантация, УМБАЛ „Александровска" – София
[4]Изпълнителна агенция по трансплантации

HUMAN BK POLYOMAVIRAL ACTIVITY IN PATIENTS WITH RENAL TRANSPLANTS

Zl. Kalvatchev[1], Il. Tsekov[1], V. Vladimirov[2], E. Paskalev[2], B. Zlatkov[3], Zh. Filipov[3] and M. Gicheva[4]

[1]Molecular Virology Laboratory, Military Medical Academy – Sofia
[2]Department of Urology and Transplantations, University Hospital "Aleksandrovska" – Sofia
[3] Department of Nephrology and Transplantations, University Hospital "Aleksandrovska" – Sofia
[4]Executive Agency for Transplantation

Резюме:

Реактивацията на човешкия полиомен вирус BK (BKV) и последствията от нея се изследват интензивно в центровете за бъбречна трансплантация по целия свят. Причина за това е възможният директен цитопатичен ефект върху трансплантирания орган, който може да причини този вирус. Ние проучихме и установихме влиянието на BKV при 50 бъбречнотрансплантирани пациенти в България. Резултатите от изследванията ни доказаха висок процент вириурия (84%), при рядко развитие на BKV асоцииран болестен процес и необратима дисфункция на присадения орган (4% от случаите). Установена бе обаче връзка между прилаганата тройна имуносупресивна схема и реактивацията на BKV. Ние считаме, че използваната неинвазивна диагностична процедура може да се прилага за рутинно проследяване на бъбречнотрансплантираните и у нас.

Ключови думи: BKV, BK асоциирана нефропатия, отхвърляне

Адрес за кореспонденция: *Проф. д-р Златко Кълвачев, дмн, Лаборатория „Молекулярна вирусология", Военномедицинска академия, бул. „Св. Г. Софийски" № 3, 1606 София, e-mail: kalvatchev@gmail.com*

Summary:

Reactivation of the Human Polyomavirus BK (BKV) and the resulting events have been extensively studied at the renal transplant centers worldwide. The virus leads to direct cytopathic alterations in the transplanted organ, which may explain the growing interest among the researchers. We have studied the influence of BKV on 50 patients with renal transplants from Bulgaria. The results showed a high level of viruria (84%), compared to rare development of BKV-associated disease and permanent dysfunction of the transplanted organ (4% of all cases). However, a relationship between the applied combination of three immunosuppressive medications and the reactivation of BKV was established. We consider that the employed non-invasive diagnostic approach may be routinely used for monitoring of patients with renal transplants in our country.

Key words: BKV, BK-associated nephropathy, transplant rejection

Address for correspondence: *Prof. Zlatko Kalvatchev, M. D., D. Sc., Molecular Virology Laboratory, Military Medical Academy, 3, Sv. G. Sofiyski Blvd., Bg – 1606 Sofia, e-mail: kalvatchev@gmail.com*

ВЪВЕДЕНИЕ

Реактивацията на човешкия полиомен вирус ВК (BKV) при пациенти с бъбречни трансплантации се приема за една от възможните причини за дисфункцията на присадения орган [1, 6]. Различни проучвания показват, че след първичната BKV инфекция, протичаща още в ранна детска възраст, вирусът остава в неактивно състояние, предимно в органите на отделителната система и над 80% от човешката популация има антитела срещу BKV [12]. Реактивация на BKV, придружена с отделянето му в урината, може да се получи при различни състояния на имунен дефицит (хематологични злокачествени заболявания, конгенитален имунен дефицит, синдром на Wislkott-Aldrich и др.), но най-засегнати са хората с бъбречни и костномозъчни трансплантации [6, 10].

По-високата възприемчивост на трансплантираните към реактивацията на BKV се дължи на комбинираното действие на множество фактори (детерминанти на реципиента, трансплантирания орган, самия вирус), но най-често е свързана с употребата на различни имуносупресивни агенти [5, 8]. За това свидетелства и увеличението на случаите с развитие на ВК асоциирана нефропатия (BK-associated nephropathy, BKAN), които от много рядко документирано състояние, вече са с честота от 1-5% сред бъбречнотрансплантираните пациенти [11]. Развитието на BKAN е свързано не само с продължителна вирурия и виремия, но и с тежка бъбречна дисфункция, водеща до отхвърляне на присадения орган в 10-100% от случаите [6, 10].

Диагнозата и скринингът на пациентите с реактивирана BKV инфекция е клинично предизвикателство. От една страна, асимптомна BKV репликация се среща като нормално явление при 10-68% от бъбречнотрансплантираните [6], но от друга, до този момент у нас няма утвърден подход при поставяне на диагнозата с изключение на биопсичното изследване, демонстриращо интерстициален нефрит с типични вирусни включвания [1].

Ние приложихме различни неинвазивни диагностични подходи (уроцитологични и молекулярни) за изследване на рискови за развитието на BKAN пациенти, при които доказахме активна вирусна репликация. Като резултат предлагаме да бъде въведен диагностичен алгоритъм за изследване реактивацията на BKV. Така е възможно да бъдат мониторирани пациентите с уринарна вирусна екскреция, при които се влошава състоянието на присадения орган и има непосредствена опасност за развитие на BKAN.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проби (урина, кръв и бъбречни некропсии) от 50 бъбречнотрансплантирани пациенти, както и 8 родствени донорно-акцепторни двойки бяха изследвани преди трансплантацията и в различен период след нея. Като контроли използвахме урина от 30 пациенти без бъбречна трансплантация, но с различна степен на увреждане на бъбречната функция. Под внимание бяха вземани възрастта, пола, видът на донора (трупен/жив), имуносупресивната схема на лечение, както и реактивацията на цитомегаловирус (CMV).

Около 50 ml първа сутрешна урина беше събирана в стерилни контейнери, съдържащи 5 ml абсолютен алкохол [3]. За получаване на уротелни клетки, небходими при цитологичните изследвания, бе използван полуавтоматичният метод на Bales [9]. Част (20-50 μl) от получената клетъчна суспензия се нанасяше върху предметно стъкло, след което се изсушаваше и фиксираше с абсолютен алкохол. Така изготвените препарати бяха оцветявани с помощта на Cytocolor® (Merck KGa, Cat.No.1.15355) според указанията на производителя и включвани в канадски балсам. Наличието на "decoy" клетки беше отчитано с помощта на светлинен микроскоп Carl Zeiss (Jena). "Decoy" клетките бяха идентифицирани по техните типични включвания от типа матово стъкло и броят им бе отчитан спрямо 10 високосилови микроскопски полета [1]. Извършвана беше и цитологична оценка за наличие на съпътстващи аденовирусни, херпессимплексни и цитомегаловирусни включвания.

От прясно събираната периферна кръв бяха отделяни плазмата и лимфоцитите (Lymphpflot; Biotest, Cat. No. 824012), които използвахме за добиване на ДНК.

Екстракцията на ДНК от урина, плазма и лимфоцити беше провеждана с помощта на фенол/хлороформ/изоамилов алкохол, с последваща преципитация в абсолютен алкохол и 3M натриев ацетат. Следваше рехидратация на получената ДНК в 30-50 μl двойнодестилирана вода и определяне на концентрация след спектрофотометрично измерване.

PCR за детекцията на BKV бе провеждан с праймери, специфични за VP1 геномния регион [7]. Амплификационните реакции бяха провеждани за обем от 50 μl, включващ 10X реакционен буфер, 1.5 mM магнезиев хлорид, 200 μM от всеки нуклеотид, 1.25 U термостабилна Taq-полимераза (5U/μl, Cat. No. 10342-020, Invitro-

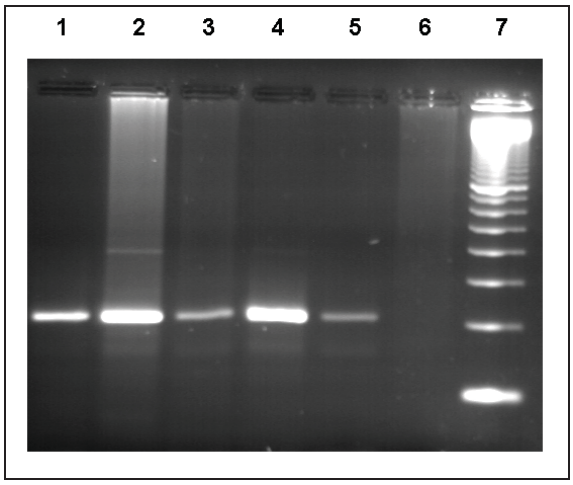
gen, USA), 5 µl (0.5 µg) ДНК и 600 nM от всеки праймер [1]. Амплификацията включваше начален етап на инкубация при 94°C/5 min последвана от тристъпков цикъл, състоящ се от денатурация на 95°C/30 s, хибридизация при 55°C за 1 min и елонгация на 72°C/1 min. Аликвоти от 25 µl от всеки PCR продукт бяха визуализирани на 2% агарозен гел с етидиев бромид, след провеждане на хоризонтална електрофореза за 80 min/100 V. Наблюдаваните бандове бяха сравнявани с тези на високомолекулярен маркер със стъпка от 100 bp (Cat. No. 15628-019, Invitrogen, USA). При всички реакции бяха използвани съответни положителни и отрицателни контроли и тест за наличие на β-глобиновия ген.

Статистическият анализ бе извършен с прилагането на критерия на Pearson със стойност от 0.05, считана като праг на достоверност на изследваните зависимости. Резултатите помежду отделните групи и честотите бяха сравнявани с one-way анализа на вариабилността ANOVA. Всички статистическите изчисления бяха извършвани със статистическия софтуер SPSS 12.0.

Резултати и обсъждане

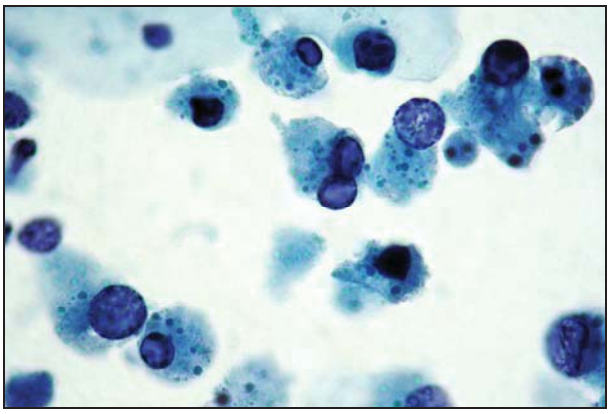
Изследваните бъбречнотрансплантирани бяха групирани според времето на трансплантацията и имуносупресивната схема: наскоро трансплантирани и третирани с тройна схема от преднизон, микофенолат мофетил и циклоспорин (31/50, 62%) и трансплантирани преди повече от 1 година, с монотерапия от циклоспорин (19/50, 38%). Отчитана беше прилаганата доза на съответните медикаменти, както и реактивацията на цитомегало-, адено- и херпес-симплекс вируси. Проби от тях бяха вземани в различен период след трансплантацията, който варираще от 1 месец до 8 г.

При PCR изследването на урина бе доказано, че голяма част (42/50, 84%) от бъбречнотрансплантираните пациенти отделят BKV (фиг. 1). Всички изследвани в посттрансплантационния период от 1 година (средно 2 месеца след трансплантацията) бяха положителни за BKV. Виремията обаче беше зависима единствено от приложената тройна имуносупресивна схема, съдържаща микофенолат мофетил ($p = 0.01$). При останалите 8/50 (16%) трансплантирани не беше отчетена BKV реактивация. Всички те бяха на поддържаща терапия с циклоспорин А.



Фиг. 1. Гел-електрофорези след PCR за BKV на урина и кръв: BKV положителни урини (линии 1 и 2); BKV положителна кръв (линии 3 и 4); положителна и отрицателна контрола (линии 5 и 6); молекулен маркер/100 bp (линия 7)

При двама от пациентите с вирурия, беше доказана и виремия с нарастващи стойности, последвана от влошаване на бъбречната функция през следващия месец. Отчетени бяха нива на серумния креатинин от 994 µmol/l (референтни граници 44.2-133.6 µmol/l). Тъй като липсваха положителни диагностични маркери за реактивирана друга вирусна инфекция или имунологичен интолеранс, ние започнахме мониториране на BKV реактивацията през 20 дни. Използвани бяха сурогатните диагностични маркери за диагностициране на BKAN – уринна цитология и PCR на урина/плазма (фиг. 1 и 2). И в двата случая пациентите постепенно развиха терминална дисфункция на графта, което причини необратима реакция на отхвърляне, последвана от експлантация на бъбрека. В изследваните бъбречни некропсични материали, с помощта на PCR беше доказано наличие на BK вирусна ДНК в големи количества (над 10^9 копия/mg).



Фиг. 2. „Decoy" клетки с различен тип BK вирусни включвания, отделяни с урината на бъбречнотрансплантираните пациенти

Проучената контролна група включваше 30 мъже и жени без трансплантации, но с различни бъбречни заболявания: пиелонефрит, гломерулонефрит и хронична бъбречна недостатъчност. При изследване на проби от урината им с помощта на PCR бяха открити 8 положителни резултата, като при 3-те с най-висок вирусен товар (над 10^4 копия/μl) беше документирано и наличие на „decoy" клетки.

Реактивацията на BKV и развиващият се като следствие от нея нефрит, са проблеми с нарастваща значимост при бъбречните трансплантации. Точната причина за нарастването на броя на тези случаи засега е неизвестна. Предполага се, че е свързана с имунодефицитното състояние, индуцирано от медикаментите, използвани за предотвратяване на процеса на отхвърляне. Клиничната картина може да варира от асимптомно състояние на виремия/вирурия или нефрит, до изразена дисфункция, свързана с отхвърляне на трансплантата [4]. Според публикуваните данни при бъбречнотрансплантирани пациенти безсимптомната BKV репликация може да варира от 10 до 68%, като не всички пациенти развиват вирус-индуцирана нефропатия [1, 6]. Нашите резултати потвърждават това – BKAN беше установен в два от случаите, а при другите се касаеше за асимптомна екскреция. Според нас най-вероятната причина за вирусната реактивация е използваната тройна имуносупресивна схема, което се споделя и от други изследователи [2].

Втората група резултати е свързана с проучване на носителството и активността (вирурия/виремия) на BKV при 8 двойки (жив донор-реципиент) преди провеждане на трансплантацията. Всички донори бяха в родствена връзка с реципиента. Изследването на донорите чрез PCR не установи вирурия и/или виремия, т.е. липсваше BKV реактивация. При реципиентите обаче вирусна активност беше доказана в 2/8 (25%) от случаите (табл. 1). Средната възраст на реципиентите беше 33.2 години и основна причина за трансплантацията беше напреднала хронична бъбречна недостатъчност.

Ние смятаме, че проучването на реактивацията на BKV при донорно-акцепторните двойки преди провеждане на трансплантация трябва да се взема предвид при последващото им проследяване като от част от алгоритъма за намаляване на риска от развитие на BKAN. Реактивираната BKV инфекция у донора или акцептора преди провеждане на трансплантацията повишава значително риска от развитие на болестно състояние след операцията.

Таблица 1. Характеристика и резултати от изследване на родствени донорно-реципиентни двойки за носителство и активност на BKV

№	*Реципиентна двойка*	*Възраст/ Пол*	*Клинично състояние*	*Резултат*	
				Плазма	*Урина*
1	Донор	59/ж	здрав[1]	–	–
	Реципиент	35/ж	ХБН[2]	–	–
2	Донор	49/м	здрав	–	–
	Реципиент	24/ж	ХБН	–	–
3	Донор	49/м	здрав	–	–
	Реципиент	28/м	ХБН	+	+
4	Донор	69/м	здрав	–	–
	Реципиент	39/м	ХБН	+	+
5	Донор	44/м	здрав	–	–
	Реципиент	21/ж	ХБН	–	–
6	Донор	62/ж	здрав	–	–
	Реципиент	57/м	ХБН	–	–
7	Донор	45/ж	здрав	–	–
	Реципиент	25/ж	ХБН	–	–
8	Донор	56/ж	здрав	–	–
	Реципиент	32/м	ХБН	–	–

Легенда: [1]здрав – отсъстващи хронични или други придружаващи заболявания (по данни от ИЗ), [2]ХБН – хронична бъбречна недостатъчност

В заключение, реактивираният BKV в урината на бъбречнотрансплантирани пациенти е указание за повишено внимание при провеждане на последващи интервенции. Реципиентите трябва да бъдат подложени на непрекъснат скрининг за уточняване степента на вирусна репликация. Ранното откриване на "decoy" клетки има важно значение за навременната диагностика на реактивираната инфекция и степента на засягане на бъбречните тъкани. Използваният от нас подход е също необходим при групиране на пациентите с най-висок риск за развитие на бъбречно усложнение след трансплантацията. Откриването на "decoy" клетки дава морфологична характеристика на активната ВК вирусна репликация и е удобен метод за бърз скрининг.

Благодарности: *Изпълнението на проучването е подпомогнато от Съвета за медицинска наука (СМН) към Медицинския университет – София, по Договор № 47/2012 към Проект № 37/2012 СМН, МУ – София.*

Библиография

1. Славов, С. Проучвания върху патогенезата и усъвършенстване на диагностиката на инфекции, причинени от Polyomavirus hominis 1 (вирус BK, BKV). Дисертация, С., НЦЗПБ, 2009.
2. Agha, I. et D. Brennan. BK virus and immunosuppressive agents. – Adv. Exp. Med. Biol., 577, 2006, 174-184.
3. Dhundee, J. et H. Rigby. Comparison of two preparatory techniques for urine cytology. – J. Clin. Pathol., 43, 1990, 1134-1135.
4. Hariharan, S. BK virus nephritis after transplantation. – Kidney Int., 69, 2006, № 4, 655-662.
5. Hirsch, H. et al. Polyomavirus associated nephropathy in renal transplantation: Interdisciplinary analysis and recommendations. – Transplantation, 79, 2005, № 10, 1277-1286.
6. Hirsch, H. et J. Steiger. Polyomavirus BK. – Lancet Infect. Dis., 3, 2003, № 10, 611-623.
7. Kalvathcev, Z., S. Slavov, A. Petrova, P. Simeonov et L. Hristova. Detection of human polyomavirus BK (BKV) in Bulgarian adult kidney transplant recipients by polymerase chain reaction. – Biotechnol. & Biotechnol. Eq., 21, 2007, № 3, 335-337.
8. Kalvathcev, Z., S. Slavov, D. Mladenov, M. Tzvetkov et J. Kotsev. Role and importance of the human polyomavirus BK (BKV) for the appearance and development of post-transplantation nephropathy. – Urology, 13, 2007, № 4, 101-109.
9. Koss, L. Diagnostic cytology of the urinary tract: With histopathologic and clinical correlations. – In: Cytologic manifestations of benign disorders affecting cells of the lower urinary tract. L. G. Koss. (Ed). Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996, 45-70.
10. Kwak, J. et al. Pathogenesis and management of polyomavirus infection in transplant recipients. – Clin. Infect. Dis., 35, 2002, 1081-1087.
11. Mengel, M. et al. Incidence of polyomavirus nephropathy in renal allografts: Influence of modern immunosuppressive drugs. – Nephrol. Dial. Transplant., 18, 2003, № 6, 1190-1196.
12. Nickeleit, V. et al. Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. – N. Engl. J. Med., 342, 2000, 1309-1315.
13. Ramos, E. et al. Clinical course of polyomavirus nephropathy in 67 renal transplant patients. – J. Am. Soc. Nephrol., 13, 2002, 2145-2151.

Постъпила за печат на 26 юли 2012 г.