

NEFROPATIA POR VIRUS BK POST TRASPLANTE RENAL DIAGNOSTICO Y SEGUIMIENTO POR PCR EN TIEMPO REAL

**MARCELA ECHAVARRIA¹, NATALIA BASILOTTA¹, ANA AGUIAR², MARIO DAVALOS², CARMEN RICARTE¹,
ALEJANDRO IOTTI³, GUADALUPE CARBALLAL¹**

¹Laboratorio de Virología Clínica, ²Sección Nefrología, ³Servicio de Anatomía Patológica,
Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas (CEMIC), Buenos Aires

Resumen La nefropatía producida por el virus BK puede llevar a la pérdida del trasplante renal. El diagnóstico etiológico es importante debido a que la clínica no permite diferenciar entre nefropatía por virus BK y rechazo agudo, en donde los tratamientos de estas dos entidades son diametralmente opuestos. El desarrollo reciente de métodos moleculares muy sensibles y específicos como PCR y PCR en tiempo real para virus BK permiten un diagnóstico de certeza en forma rápida y cuantificar la carga viral presente. El diagnóstico de nefropatía por virus BK se realiza por inmunohistoquímica en una biopsia renal, pero dada la naturaleza multifocal de las lesiones, la sensibilidad no siempre es del 100%. Los nuevos métodos de PCR para detectar virus BK en sangre y orina contribuyen al diagnóstico de nefropatía de una manera más normatizada y menos invasiva. Más aún, la cuantificación del virus BK en sangre por PCR en tiempo real, ha demostrado ser útil en el diagnóstico y monitoreo de esta enfermedad. En este trabajo se presenta el caso de una paciente transplantada renal con nefropatía por virus BK y el desarrollo de un método de PCR en tiempo real para la detección de virus BK en sangre y orina. Esta nueva metodología confirmó el diagnóstico de nefropatía por virus BK lo que permitió un cambio en el esquema de inmunosupresión y la instauración de un tratamiento que pudo ser monitorizado utilizando la carga viral.

Palabras clave: virus BK, nefropatía, trasplante renal, PCR en tiempo real

Abstract *BK virus nephropathy after renal transplantation. Diagnosis and prognosis by real time PCR.*

BK virus nephropathy may lead to kidney transplant failure. BK infection and acute rejection are clinically undistinguishable, therefore diagnosis of these entities is critical to establish the correct treatment. The new molecular methods using PCR and real time PCR have significantly contributed to the rapid and sensitive diagnosis of BK virus. Furthermore, viral load determination in plasma has significantly been associated with BK virus nephropathy. Definite diagnosis of nephropathy requires renal biopsy, although due to the multifocal nature of the disease sensitivity may be less than 100%. BK detection in blood and urine by PCR has contributed to the diagnosis of nephropathy in a more standardized and less invasive way. Recently, quantification of BK virus in plasma has been used for the diagnosis and monitoring of this disease. In the present study, we describe the validation of a real time PCR method for BK virus detection in plasma and urine and its application for diagnosis and monitoring in a renal transplant patient with nephropathy.

Key words: BK virus, nephropathy, renal transplantation, real time PCR

El virus BK es un virus de ADN que pertenece a la familia *Polyomaviridae*. La infección primaria ocurre frecuentemente durante la niñez y la transmisión es probablemente por vía orofaríngea. Suele cursar en forma asintomática o con síntomas respiratorios leves y fiebre. El virus BK puede permanecer latente en el tracto urogenital, especialmente en riñón. Durante estadios de inmunosupresión, este virus puede reactivarse y causar

enfermedades tales como estenosis ureteral, cistitis hemorrágica y nefritis tubulointersticial.

La nefropatía por virus BK, descrita hace más de 30 años pero reconocida clínicamente por primera vez en 1995¹, es causa de disfunción del injerto renal en pacientes transplantados, pudiendo llevar a la pérdida del mismo. La nefropatía asociada a virus BK se observa entre el 1-10% de los casos². La mayoría de los casos ocurren dentro del primer año post-trasplante, aunque se han informado infecciones hasta 3 años post-trasplante³. La pérdida de injerto puede ocurrir en 10-80%⁴ de los casos. Estos porcentajes son menores en aquellos centros donde se realiza una vigilancia periódica

Recibido: 11-I-2007

Aceptado: 6-VIII-2007

Dirección Postal: Dra. Marcela Echavarría, Laboratorio Virología Clínica, CEMIC, Av. Galván 4102, 1431 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4541-3790 e-mail: mechavarría@cemic.edu.ar

ca de infección por virus BK y se instituye un tratamiento precoz^{4,5}.

Los factores de riesgo asociados a la nefropatía por virus BK incluyen el uso de tres o cuatro clases de drogas inmunosupresoras, en especial en combinaciones con tacrolimus o micofenolato mofetil, el estado serológico negativo para virus BK del receptor y el "mismatch" de HLA del trasplante. El sexo masculino, edad adulta y enfermedades de base como diabetes mellitus, también se han asociado con mayor riesgo de desarrollar nefropatía por virus BK⁶. El diagnóstico de nefropatía por virus BK se confirma por inmunohistoquímica en biopsias renales. Sin embargo, dada la naturaleza multifocal de las lesiones, la sensibilidad se puede ver afectada por errores en el muestreo⁷. Por ello, los estudios virológicos como la detección de viremia y viruria de BK por PCR contribuyen al diagnóstico de nefropatía.

El diagnóstico de infección por virus BK puede realizarse por métodos citológicos tales como la búsqueda de células "decoy" en orina, o por métodos moleculares como PCR en sangre u orina. La presencia de células "decoy" en orina puede utilizarse como método de tamizaje para la infección por virus BK dado su menor costo y alta sensibilidad para identificar replicación viral. Sin embargo, el valor predictivo positivo de nefropatía ha resultado menor al 20%^{8, 9}. Los métodos moleculares que incluyen la detección del ADN del virus BK en sangre u orina, alcanzan mayores valores predictivos positivos de nefropatía. La PCR para virus BK en orina también puede utilizarse como método de tamizaje para el diagnóstico de nefropatía. Sin embargo, es la detección de virus BK en plasma la que mejor se correlaciona con esta enfermedad^{3, 10}. La cuantificación del virus BK en plasma, especialmente cuando es superior a ciertos valores, permite obtener mayores valores predictivos positivos de enfermedad. Más aún, la cuantificación del virus BK o carga viral, permite monitorizar la evolución de los pacientes con nefropatía^{3, 10, 11, 12}. Esta cuantificación se realiza por métodos de PCR en tiempo real que permiten asignar un valor absoluto en copias/ml.

En este trabajo presentamos el desarrollo y validación de un método de PCR en tiempo real para la detección de virus BK en sangre y orina y su aplicación en el diagnóstico y seguimiento de nefropatía en una paciente transplantada renal.

Caso clínico

Se presenta una paciente de sexo femenino de 26 años que recibió un trasplante renal, de donante vivo relacionado, en agosto de 2002. A partir de la semana 77 post-trasplante (marzo de 2004) la paciente inició un franco deterioro de su función renal presentando un aumento continuo en los niveles de creatinina respecto de su nivel basal de 1.42 mg/dl (Tabla 1). Para el diagnóstico de su deterioro de la función renal, se realizaron biopsias renales a distintos tiempos post-

trasplante (semanas 77, 79, 86 y 90). Las biopsias informaron rechazo agudo grado IB e inclusiones tipo viral (Tabla 1). Teniendo en cuenta estos hallazgos, se realizaron estudios para la detección de CMV. La antigenemia pp65 fue positiva (2 núcleos/2 x 10⁵ células) y la PCR en leucocitos para CMV también fue positiva. La paciente recibió ganciclovir más gammaglobulina humana.

Ante la persistencia del deterioro de la función renal y la negativización del CMV en sangre, se decidió la búsqueda de virus BK en orina. Ante la presencia de inclusiones tipo viral en la biopsia renal, se tomaron muestras de sangre y orina a distintos tiempos post trasplante para la detección de virus BK con PCR cualitativa y cuantitativa. Como factor de riesgo, asociado a nefropatía por virus BK, la paciente presentaba un esquema de inmunosupresión con tacrolimus, micofenolato mofetil y esteroides (Tabla 1). Para el desarrollo de la PCR en tiempo real para virus BK, se seleccionaron "primers" que amplifican el gen del antígeno T (un gen temprano)¹³, se compararon sondas marcadas con dos fluoróforos, FAM-TAMRA Y FAM-BHQ (*Black Hole Quencher*), y diferentes condiciones de ciclado. La sensibilidad analítica fue de 10⁴ copias/ml con ambas sondas utilizadas cuando se aplicó el esquema de 45 ciclos a 95 °C durante 15 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s. Los resultados de la nueva PCR en tiempo real correlacionaron con la PCR cualitativa empleada habitualmente en nuestro laboratorio (Tabla 1). En la semana 84, la PCR en orina para virus BK fue positiva por lo cual se rotó el esquema de inmunosupresión (Tabla 1). La infección por virus BK se confirmó en la tercera biopsia por inmunomarcación con un monoclonal para SV 40 (polioma-virus). Además, se cuantificó el virus BK en orina y sangre a partir del CT obtenido de 15.46 y 27.89 respectivamente (Fig. 1). En la semana 90 se realizó la cuarta biopsia en la cual persistió el infiltrado intersticial y la positividad con inmunohistoquímica. Teniendo en cuenta que la carga viral para BK en sangre aumentó a 5 x 10⁶ copias/ml, se agregó tratamiento empírico con gatifloxacina. En la semana 93, la paciente mostró un incremento de la creatinina a valores de 4.3 mg/dl con altos valores de viremia de BK, por lo tanto se continuó con gatifloxacina. En la semana 113, la creatinina descendió a 3.17 mg/dl y la carga viral para virus BK fue indetectable en sangre. Si bien la paciente no recuperó la función renal inicial, la creatinina plasmática se estabilizó posteriormente en 4 mg/dl, con un *clearance* de creatinina medido de 19 ml/min. En la actualidad, (octubre de 2006) la paciente conserva aún su riñón trasplantado y no ha requerido diálisis.

Discusión

Con esta paciente, se destaca la importancia del diagnóstico de certeza de infección por virus BK y la utilidad para el pronóstico de la enfermedad de los métodos moleculares. Esta herramienta permitió documentar la presencia del virus en el contexto de un infiltrado intersticial y deterioro brusco de la función renal. Estas características morfológicas también se observan frente a situaciones de rechazo agudo. Debido a que el tratamiento de rechazo agudo implica un aumento de la inmunosupresión, y la replicación viral requiere una disminución de la inmunosupresión, es imprescindible contar con herramientas sensibles y específicas que contribuyan a determinar un diagnóstico preciso. En esta paciente, el esquema de inmunosupresión fue disminuido y

TABLA 1.– Seguimiento de la función renal, diagnóstico virológico y anatomopatológico e intervención terapéutica en una paciente trasplantada renal.

	SEMANAS POST TRASPLANTE						
	77	79	84	86	90	93	113
Creatinina (mg/dl)	2.12	2.24	2.67	2.9	3.5	4.3	3.17
Biopsia renal	Rechazo agudo grado IB	Rechazo agudo grado IB, inclusiones tipo viral	-	Rechazo agudo grado IB, inclusiones tipo viral	Rechazo agudo grado IB, inclusiones tipo viral	-	-
Inmunohistoquímica	-	-	-	Poliomavirus positivo	BK virus positivo	-	-
PCR CMV (leucocitos)	-	(+)	-	(-)	-	(-)	-
CMV antigenemia (pp65)	-	(+) 2 núcleos	(-)	-	(-)	-	-
Virus BK en plasma				2 exp 6 copias/ml (+)	5 exp 6 copias/ml (+)	4 exp 5 copias/ml (+)	no detectable (-)
Virus BK en orina				> 10 exp 9 copias/ml (+)	> 10 exp 9 copias/ml (+)	-	-
Inmunosupresión/ Tratamiento	Metilprednisona Metilprednisolona Tacrolimus MMF	Metilprednisona Metilprednisolona Tacrolimus MMF Gammaglobulina Ganciclovir	Metilprednisona Tacrolimus MMF Ganciclovir	Metilprednisona Metilprednisolona Tacrolimus MMF	Metilprednisona Ciclosporina MMF Gammaglobulina Ganciclovir Gatifloxacina	Metilprednisona MMF Ganciclovir Gatifloxacina	Metilprednisona Everolimus Gatifloxacina

MMF: mofetil micofenolato; CMV: citomegalovirus; (+): positivo; (-): negativo; >: mayor

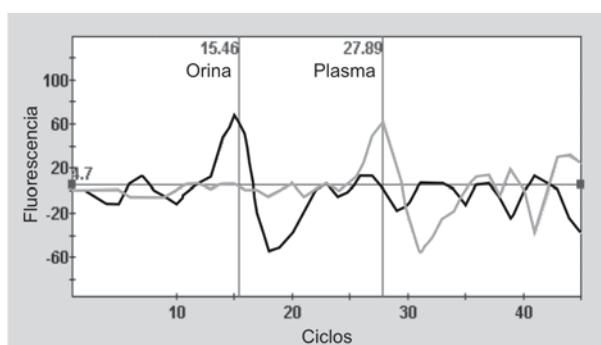


Fig. 1.– PCR en tiempo real para virus BK en muestras de sangre y orina de una paciente trasplantada renal. Las curvas representan la segunda derivada de la detección de fluorescencia en función de los ciclos de PCR. El pico máximo se correlaciona con el CT (Ciclo que atraviesa el umbral "Threshold"). Con el CT (15.46 para orina y 27.89 para plasma) se calcula la carga viral en la muestra.

posteriormente rotado frente al diagnóstico de certeza de nefritis por virus BK. Esta intervención no se hubiera considerado si sólo se hubiera sospechado un rechazo agudo.

A pesar de haberse encontrado un resultado positivo para CMV en sangre por PCR y antigenemia pp65, la paciente no presentó enfermedad compatible con CMV

ya que no presentó ni colitis, ni hepatitis, ni neumonitis ni esofagitis. Este hallazgo puntual podría deberse a reactivación asintomática del virus. Sin embargo, recibió inicialmente tratamiento empírico con ganciclovir.

La implementación de la PCR en tiempo real permitió asociar el valor de carga viral en sangre con la nefropatía asociada. Se ha postulado que valores de carga viral en plasma mayores a 1×10^4 copias/ml tienen un mayor valor predictivo de enfermedad comparado con el hallazgo del virus en orina¹⁰⁻¹². En nuestra paciente se observaron cargas virales mayores a 1×10^4 copias/ml de plasma, que coincidieron con la presencia de inclusiones virales en las biopsias renales.

Al momento, no existe un tratamiento específico para la enfermedad por virus BK. Sin embargo, dado que se considera la replicación viral asociada a un exceso de inmunosupresión, se han implementado intervenciones terapéuticas tales como cambio o disminución de la misma. El uso de ciertos antivirales tales como cidofovir están actualmente incorporándose como tratamiento en esta infección¹⁴. Llamativamente, en un ensayo piloto realizado en 10 pacientes trasplantados renales con evidencia de infección activa por virus BK se implementó el uso de un antibiótico de amplio espectro (gatifloxacina) para el tratamiento de la infección por virus BK. En este trabajo, 70% de los pacientes disminuyeron la carga viral en san-

gre (Chandraker A., et al, *American Transplant Congress*, Boston, 2004). Basados en estos resultados, se trató empíricamente a nuestra paciente con gatifloxacina.

Un consenso reciente ha recomendado el tamizaje cada tres meses para virus BK en pacientes trasplantados renales durante los primeros dos años post-trasplante, y luego anualmente hasta cinco años post-trasplante en muestras de orina. En nuestra institución, se evalúan los pacientes trasplantados renales para virus BK por PCR (cualitativa) en sangre y orina cuando muestran un deterioro de la función renal. En aquellos pacientes con un resultado positivo de PCR en sangre, se determina la carga viral en plasma por PCR en tiempo real.

En conclusión, este nuevo método de PCR en tiempo real permitió confirmar el diagnóstico de nefropatía por virus BK en una paciente trasplantada renal cuya biopsia demostraba signos compatibles con rechazo. La cuantificación del virus BK en sangre permitió monitorear la evolución de la enfermedad y el *clearance* del virus. Esta metodología molecular de detección y cuantificación del virus BK por PCR es una herramienta nueva de diagnóstico que puede ser utilizada como marcador temprano de nefropatía por virus BK.

Bibliografía

1. Purighalla R, Shapiro R, McCauley J, Randhawa P. BK virus infection in a kidney allograft diagnosed by needle biopsy. *Am J Kidney Dis* 1995; 26: 671-3.
2. Hirsch H, Brennan D, Drachenberg C, et al. Polyomavirus-Associated Nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation* 2005; 79: 1277-86.
3. Hirsch H, Knowles W, Dickenmann M, et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 2002; 347: 488-96.
4. Buehrig CK, Lager DJ, Stegall MD, et al. Influence of surveillance renal allograft biopsy on diagnosis and prognosis of polyomavirus-associated nephropathy. *Kidney Int* 2003; 64: 665-73.
5. Brennan DC, Agha I, Bohl DL, et al. Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *Am J Transplant* 2005; 5: 582-94.
6. Ginevri F, De Santis R, Comoli P, et al. Polyomavirus BK infection in pediatric kidney-allograft recipients: a single center analysis of incidence, risk factors, and novel therapeutic approaches. *Transplantation* 2003; 75: 1266-70.
7. Drachenberg C, Papadimitriou J, Hirsh HH, et al. Histological patterns of Polyomavirus nephropathy: Correlation with graft outcome and viral load. *Am J Transplant* 2004; 4: 2082-92.
8. Hirsch H. Polyomavirus BK nephropathy: A (re)-emerging complication in renal transplantation. *Am J Transplant* 2002; 2: 25-30.
9. Nicleleit V, Hirsch H, Binet IF, et al. Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:1080-9.
10. Limaye A, Jerome KR, Kuhr CS, et al. Quantitation of BK virus load in serum for the diagnosis of BK virus-associated nephropathy in renal transplant recipients. *J Infect Dis* 2001; 183: 1669-72.
11. Hirsch H, Mohaupt M, Klimkait T. Prospective monitoring of BK virus load after discontinuing sirolimus treatment in a renal transplant patient with BK virus nephropathy. *J Infect Dis* 2001;184: 1494-5.
12. Randhawa P, Ho A, Shapiro R, et al. Correlates of quantitative measurement of BK polyomavirus (BKV) DNA with clinical course of BKV infection in renal transplant patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1176-80.
13. Arthur RR, Dagostin S, Shah KV. Detection of BK virus and JC virus in urine in brain tissue by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1174-9.
14. Lim W, Mathew TH, Cooper JE, Bowden S, Russ GR. Use of cidofovir in polyoma-virus BK viral nephropathy in two renal allograft recipients. *Nephrology* 2003; 8: 318-23.

El oficio más parecido al de bibliotecario es el de panteonero. En la biblioteca los espíritus verdaderamente superiores descansan en paz, inaccesibles a la estulticia humana y en esto debe consistir su mayor gloria. Encastillados en sus estantes, los grandes taciturnos permanecen hoy tan hostiles al vulgo como lo fueron en vida.

Juan Carlos Dávalos (1885-1959)

Reflexiones de un bibliotecario (Airampo, 1925). Poesía, prosa: cuentos, notas, ensayos, relatos. Salta: Hernán Javier Dávalos y Arturo Dávalos, 2001, p 161