

**DOTTORATO DI RICERCA IN METODOLOGIE SPERIMENTALI
ED APPLICAZIONI TECNOLOGICHE IN CHIRURGIA
CICLO XXIII**

**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA**

Dott. Vanessa Scriffignano

**MONITORAGGIO DEL BK VIRUS NEI PAZIENTI
TRAPIANTATI DI RENE**

TESI DI DOTTORATO

Coordinatore e Tutor:

Prof. Pierfrancesco Veroux

QUADRIENNIO 2007-2011

INDICE

Riassunto	pag. 3
Introduzione	pag. 4
Valutazione del candidato al trapianto di rene	pag. 8
Controindicazione del candidato al trapianto di rene	pag. 10
Trapianto di organo solido	pag. 12
Trapianto di rene da donatore cadavere	pag. 13
Trapianto di rene da donatore vivente	pag. 16
Complicanze immunologiche	pag. 18
I farmaci immunosoppressori	pag. 20
Follow-up del paziente trapiantato di rene	pag. 25
Complicanze infettive	pag. 27
Timing delle principali infezioni dopo trapianto	pag. 28
Tipi di infezioni	pag. 32
Infezioni da Citomegalovirus	pag. 35
Infezioni da Polyomavirus	pag. 37
Scopo dello studio	pag. 45
Materiali e metodi	pag. 47
Risultati	pag. 50
Discussione	pag. 53
Conclusioni	pag. 57
Bibliografia	pag. 58
Legenda alle figure	pag. 69
Tabelle e figure	pag. 70-76

RIASSUNTO

Premessa: La nefropatia associata a BK virus (BKVAN) può essere diagnosticata solo mediante biopsia del graft renale. La mancanza di terapia efficace impone la diagnosi precoce dell'attivazione del virus BK, per prevenire la BKVAN nei pazienti nefro-trapiantati. La diagnosi precisa di BKVAN richiede la dimostrazione della replicazione del virus BK nel tessuto renale trapiantato. L'analisi non invasiva delle urine e del sangue è considerata essenziale nello screening nei pazienti nefro-trapiantati. Infatti, BKV è escreto nelle urine prima che possa essere identificato nel plasma. Il presente studio ha analizzato il valore predittivo della BK viruria per lo sviluppo della BK viremia e il suo possibile vantaggio per predire precocemente la BKVAN.

Metodi: In 52 pazienti sottoposti a trapianto renale tra Novembre 2007 e Marzo 2009, è stata realizzata un'analisi prospettica, per cercare la positività del BKV attraverso una reazione polimerasica a catena real-time. Sono stati analizzati un totale di 502 campioni di siero e urine in 5 diverse misurazioni nel corso del primo anno dopo trapianto.

Risultati: Durante il primo anno dopo trapianto, l'8% e il 6% dei campioni eccedevano il valore soglia di BKV nelle urine e nel siero rispettivamente. La BK viremia era preceduta dalla BK viruria: il picco della carica virale e il numero di pazienti positivi apparivano durante il terzo e il sesto mese dopo trapianto, per le urine e il siero rispettivamente.

Conclusioni: La BK viruria sostenuta è un marker attendibile che permette un'identificazione precoce dei pazienti ad alto rischio di sviluppo della BKVAN e quindi garantire interventi terapeutici precoci.

INTRODUZIONE

Il trapianto di rene rappresenta il trattamento elettivo per i pazienti affetti da insufficienza renale cronica in fase terminale, e consente alla maggioranza dei riceventi il ritorno ad una vita socialmente produttiva ed una maggiore aspettativa di vita.

L'intervento chirurgico consiste nel trapiantare un rene sano, prelevato da un donatore cadavere o donatore vivente, nella fossa iliaca del paziente. E' stato calcolato che nei pazienti trapiantati di rene il rischio relativo di morte a 18 mesi dall'intervento, rispetto a quelli in lista d'attesa, e' di 0,32%, con un tasso di mortalita' inferiore del 50-80% (1). Tuttavia ancora oggi esiste una notevole discrepanza tra il numero di pazienti in lista di attesa e gli organi disponibili; nel 2008 a fronte di 7070 pazienti con insufficienza renale cronica solo 1533 di essi sono stati trapiantati, ed a oggi il tempo di attesa per il trapianto e' di 3 anni e 11 mesi con una mortalita' in quel periodo del 1.53% (1, 2).

Nei paesi occidentali le cause piu' frequenti di insufficienza renale cronica negli adulti sono rappresentate dal diabete mellito (42%), seguito dalla nefropatia ipertensiva (25,5%) e dalla glomerulonefrite (8,4%) mentre nei pazienti in eta' pediatrica le cause piu' frequenti sono le malattie ereditarie (37%) seguite dalle glomerulonefriti (31%) (1).

Il successo del trapianto, oltre al miglioramento delle tecniche chirurgiche, e' da attribuire soprattutto alla scoperta dei farmaci immunosoppressori che hanno sensibilmente diminuito il rigetto cellulare acuto, assicurando un aumento della sopravvivenza del paziente. Tuttavia, questi farmaci, pur garantendo un'immunosoppressione efficace facilitano l'insorgenza di infezioni, che rappresentano la seconda causa di morte nei pazienti trapiantati. Ecco quindi che i processi infettivi ed il rigetto sono strettamente correlati ed entrambi giocano un ruolo chiave nel successo dell'intervento chirurgico (3) Si stima che circa i due terzi dei pazienti trapiantati

incontra in almeno un episodio infettivo entro il primo anno dopo il trapianto, ed in particolare la nefropatia interstiziale associata all'infezione da BK virus, BK virus-associated nephropathy (BKVAN) rappresenta una delle infezioni che più frequentemente è responsabile della perdita dell'organo trapiantato (4). La perdita del rene trapiantato in seguito alla riattivazione del BK virus nell'epitelio del tubulo renale, polyomavirus-associated nephropathy (PVAN) varia dal 1% all'10% dei casi, e tale percentuale risulta più bassa nei centri che hanno attivato programmi di sorveglianza e di intervento preventivo (5).

Cenni di storia del trapianto di rene. Il primo trapianto renale venne eseguito su un cane nel 1902 dal chirurgo Austriaco Ulmann (6). L'organo venne alloggiato nel collo dell'animale, e l'arteria e la vena renale furono anastomizzate rispettivamente con l'arteria carotidea e la vena giugulare. Successivamente negli anni 30 Voronoy effettuò i primi sei trapianti di rene nell'uomo, i quali però non furono coronati da successo (7). Voronoy fu comunque il primo chirurgo che mise in luce i problemi legati alla presenza di anticorpi specifici contro l'organo trapiantato nel siero dei riceventi mentre si deve a Peter Medawar, premio Nobel per la medicina nel 1960, l'applicazione del concetto di risposta immunologica (8). Il primo trapianto di rene della storia clinica mondiale coronato da successo venne eseguito nel 1954 a Boston da Joseph Murray tra gemelli omozigoti. L'organo venne alloggiato nella fossa iliaca, e la tecnica prevedeva l'anastomosi dell'arteria e della vena renale del graft rispettivamente con l'arteria e la vena iliaca esterna (9).

In Italia il primo trapianto di rene venne eseguito verso la fine degli anni sessanta dal chirurgo Paride Stefanini in una paziente affetta da insufficienza renale cronica (10). Il trapianto ebbe successo con un ripristino della normale funzionalità renale che tuttavia durò solo 4 mesi poiché la paziente morì a causa di una sepsi. In parallelo al miglioramento delle tecniche

chirurgiche crescevano le conoscenze sui meccanismi immunologici che regolano l'interazione ospite-organo trapiantato.

Nel 1977, con la scoperta di un farmaco immunomodulatore, denominato Ciclosporina, ad opera del medico Svedese Jean Borel, si ebbe la svolta decisiva nella storia dei trapianti d'organo, con un considerevole miglioramento della sopravvivenza dell'organo a un anno dal trapianto che si attestava intorno al 58% nel trapianto da donatore da cadavere, e del 75% (11) nel trapianto da donatore da vivente. Oggi, oltre all'impiego della Ciclosporina, l'uso combinato di altri farmaci immunosoppressori, come il Mofetil Micofenolato, il Tacrolimus, il Sirolimus e l'Everolimus, ha permesso di ottenere una sopravvivenza del 100% per organo e paziente a 5 anni dall'intervento; il paziente che riceve un rene da donatore vivente presenta una sopravvivenza a 5 anni del 90% ed un'emivita del graft di oltre 30 anni. Nel caso di trapianto di rene da donatore cadavere la sopravvivenza del ricevente a 5 anni dall'intervento è dell'81%, con un'emivita del graft di circa 14 anni (12) (Tabella 1).

Tale dato trova conferma dai dati della United Network for Organ Sharing degli Stati Uniti D'America, che rappresenta il centro che possiede il più grande data base mondiale sui trapianti di organo solido. Attualmente, i Centri Trapianto di Rene in Italia sono 43, distribuiti su tutto il territorio nazionale ad eccezione della Basilicata, del Molise e della Valle Aosta. L'attività di ciascun centro varia in base al numero di donazioni presenti nella regione a cui il centro trapianti afferisce, e dal numero di centri trapianto presenti nella stessa regione. In quest'ultimo caso infatti, la presenza di più centri nell'area interregionale, può determinare un rallentamento dell'attività di trapianto di ciascun centro, ripercuotendosi sulla velocità di trapianto dei pazienti iscritti in lista attiva nel centro d'appartenenza.

VALUTAZIONE DEL CANDIDATO AL TRAPIANTO DI RENE

Il tipico paziente candidato al trapianto d'organo è un individuo affetto da patologia che abbia determinato la disfunzione irreversibile di uno o più organi trapiantabili. Per ogni organo esistono criteri specifici che permettono l'inclusione o l'esclusione di un dato paziente in lista d'attesa; sulla base dei risultati delle analisi e delle valutazioni effettuate l'equipe medica del Centro Trapianti decide se il trapianto sia l'unica terapia possibile per il paziente tenendo conto di: prospettive di successo, eventuali complicanze, conseguenze mediche, sociali e psicologiche, *compliance* del paziente alla terapia immunosoppressiva *long life* ed ai controlli clinici, ematobiochimici e strumentali programmati ad intervalli stabiliti.

La valutazione dei pazienti affetti da insufficienza renale cronica per l'immissione nella lista d'attesa al trapianto rappresenta uno degli aspetti più importanti di tutto il processo che si concluderà con l'atto chirurgico. I pazienti dializzati dopo aver eseguito tutti gli accertamenti clinici e le analisi immunologiche necessari per l'intervento, vengono inseriti in una lista attiva di trapianto da donatore cadavere, e vi permangono per un periodo di attesa variabile, che dipenderà dalle caratteristiche genetiche ed immunologiche del ricevente e dal numero di reni disponibili. Nel trapianto da cadavere, infatti, i reni vengono assegnati al ricevente in base alla tipizzazione tissutale, che prevede la compatibilità del gruppo ABO e la compatibilità degli antigeni linfocitari del sistema maggiore di istocompatibilità, human leucocitary antigen (HLA).

L'HLA si esprime sulla superficie cellulare attraverso un gruppo di antigeni e il riconoscimento di questo sistema antigenico come non self da parte dell'organismo ricevente rappresenta il meccanismo immunologico principale che determinerà il rigetto dell'organo trapiantato. Indipendentemente dal tipo di trapianto, da vivente o da cadavere, la compatibilità

del gruppo sanguigno e il test di tipizzazione HLA rappresentano gli esami genetici più appropriati per garantire una migliore sopravvivenza dell'organo trapiantato.

La strategia principale per limitare il rischio di rigetto consiste nel minimizzare le differenze alloantigeniche fra donatore ed ospite, quindi maggiori saranno il numero di alleli condivisi tra donatore e ricevente soprattutto per molecole del tipo HLA-A, HLA-B e HLA-DR più elevata sarà la probabilità che il rene sopravviva dopo il trapianto (13).

Un altro test richiesto dai Centri Trapianto per l'inserimento in lista attiva è il test di Cross-Match. Questo test ha lo scopo di valutare la presenza di anticorpi citotossici nel siero del ricevente, in quanto capaci di provocare un rigetto immediato dell'organo trapiantato. Poiché tale test risulta molto importante per la buona riuscita dell'intervento, tutti i pazienti durante l'attesa per il trapianto da cadavere eseguono periodici test di Cross-match, generalmente ogni tre mesi, contro i linfociti di un panel o di un gruppo di controllo. Il livello di anticorpi citotossici può essere variabile, ma una positività significativa e costante nel tempo costituisce un fattore predittivo di una elevata probabilità di rigetto dopo il trapianto e pertanto il paziente deve essere escluso dalla lista di attesa, malgrado il gruppo sanguigno e la tipizzazione tissutale possano risultare compatibili (14).

CONTROINDICAZIONI DEL CANDIDATO AL TRAPIANTO DI RENE

La valutazione dei pazienti affetti da insufficienza renale cronica per l'inserimento nella lista d'attesa al trapianto, rappresenta un processo essenziale per la buona riuscita dell'intervento chirurgico, sebbene fino ad oggi, sono poche le condizioni cliniche che rappresentano una controindicazione assoluta al trapianto di rene. Tra queste, le neoplasie rappresentano una controindicazione assoluta al trapianto, in quanto la terapia immunosoppressiva, favorirebbe la proliferazione delle cellule tumorali. A tal proposito in assenza di qualunque segno di recidiva le linee guida indicano un periodo di osservazione di almeno cinque anni (15). Altre controindicazioni sono rappresentate da patologie metaboliche, come l'iperossalosi quando sono in fase attiva, e dalle malattie croniche in fase avanzata quali le cardiopatie evolutive, l'aterosclerosi in fase diffusa, l'insufficienza respiratoria cronica e il diabete insulino-dipendente (16). Anche alcune malattie infettive quali la tubercolosi e le epatiti virali, risentono dell'effetto immunosoppressivo della terapia antirigetto, con conseguente proliferazione dell'agente eziologico (17).

Negli ultimi anni, per incrementare il numero dei trapianti, e' stata introdotta la possibilita' di utilizzare donatori HBsAg positivi, HCV positivi, e anti- HBc positivi, in riceventi affetti dalla stessa patologia o immunizzati contro di essa (18). L'utilizzo di questa categoria di donatori presuppone una precisa informazione del ricevente mediante un consenso informato sugli eventuali rischi infettivi post-trapianto. Infine, un'altra categoria di pazienti considerati fino a qualche anno fa assolutamente controindicati al trapianto sono i pazienti sieropositivi all'infezione da HIV che oggi invece vengono trapiantati anche se solo in casi selezionati, con risultati incoraggianti (19).

I donatori rappresentano quindi una categoria di individui clinicamente molto eterogenea. A tal fine per la buona riuscita del trapianto sono state elaborate, da un gruppo di lavoro della Consulta Tecnica Permanente per i Trapianti, (Decreto legge 91\99 marzo 2003) delle Linee Guida che definiscono il *rischio dell'utilizzo degli organi donati* in 5 livelli (20, 21):

1) il rischio “inaccettabile”: presente nei donatori nei quali vengono evidenziati criteri di assoluta esclusione;

2) il rischio “standard”: presente nei donatori cosiddetti “ottimali”;

3) il rischio “aumentato”: presente nei donatori cosiddetti “accettabili”;

4) il rischio “calcolato”

5) il rischio “non valutabile”: che limita l'utilizzo degli organi donati alle sole emergenze.

Recentemente tale definizione è stata sostituita con quella di “rischio potenzialmente elevato per patologie infettive”, che riguarda quei casi, nei quali la valutazione non permette un'adeguata classificazione del rischio, in quanto il donatore nelle ultime due settimane precedenti la donazione, avrebbe tenuto dei comportamenti ad elevato rischio di acquisizione di patologie infettive, come l'uso di droghe, rapporti sessuali promiscui, l'esposizione a sangue infetto o la detenzione in ambiente carcerario.

Infine un'altra controindicazione relativa al trapianto renale è rappresentata dall'età avanzata dei candidati (15). Negli anni ottanta l'età massima per ricevere un trapianto era 50 anni, mentre attualmente il limite accettato dalla maggior parte dei Centri Trapianto è 65 anni, anche se in alcuni casi è possibile assistere al trapianto di pazienti di età superiore ai 70 anni, in quanto la scelta dei pazienti da trapiantare, non si basa soltanto su un criterio convenzionale fissato in modo rigido, ma considera le caratteristiche dei singoli candidati.

TRAPIANTO DI ORGANO SOLIDO

E' un intervento chirurgico suddiviso in due fasi: il prelievo dell'organo da un soggetto detto donatore ed il successivo impianto dell'organo stesso in un soggetto detto ricevente, associato all'eventuale espianto dell'organo non funzionante in quest'ultimo. La legge 91/99, "*Disposizioni in materia di prelievi e di trapianti di organi e tessuti*" vieta il prelievo delle gonadi, dell'encefalo e la manipolazione genetica di embrioni anche a fini di trapianto d'organo. Teoricamente, qualsiasi organo o tessuto può essere prelevato da un donatore e trapiantato in un ricevente. In realtà gli organi solidi che ad oggi vengono utilizzati per il trapianto sono i seguenti: rene, fegato, cuore, polmone, pancreas e intestino

Il prelievo di organi a scopo di trapianto viene effettuato in massima parte da **donatori cadaveri** le funzioni vitali dei quali vengono sostenute artificialmente per mantenere il più a lungo possibile inalterate qualità e vitalità degli organi da trapiantare. Nonostante questo, assume un grande rilievo la possibilità di prelevare organi da **donatori viventi** a condizione di non mettere a repentaglio la vita del donatore stesso, allo scopo di ovviare al *gap* esistente tra richiesta ed offerta di organi e per diminuire i tempi d'attesa (22)

TRAPIANTO DI RENE DA DONATORE CADAVERE

Nel trapianto da cadavere il rene dopo il consenso dei familiari, viene prelevato da un individuo deceduto generalmente per morte traumatica o per cause cerebro-vascolari, e viene trapiantato nell'organismo del ricevente. Dopo aver effettuato le opportune procedure necessarie a diagnosticare lo stato di morte cerebrale e ricevuto l'assenso alla donazione da parte dei familiari, si procede al prelievo degli organi i quali vengono conservati in uno speciale liquido a bassa temperatura fino al momento in cui verrà effettuato il trapianto. I criteri per la diagnosi di morte cerebrale sono prestabiliti dal D.M. 582 del 1994 attuativo della legge 578 del 1993 che prevede, dopo l'accertamento di morte cerebrale, un periodo di osservazione di almeno 6 ore da parte di un collegio di tre medici, mentre la legge 644 del 1975 regola il prelievo degli organi e prevede il divieto soltanto se in vita ci sia stata un'opposizione esplicita della persona, oppure in caso di opposizione dei familiari (23).

Parallelamente alle procedure di prelievo vengono compiute le procedure di identificazione del ricevente, in quanto l'obiettivo è quello di trapiantare l'organo al paziente in lista d'attesa che abbia le condizioni immunologiche più favorevoli in termini di compatibilità. A questo punto viene richiamato il potenziale ricevente per effettuare gli ultimi esami ematochimici e strumentali ed eventualmente anche una seduta di dialisi. Il rene da trapiantare viene posizionato in fossa iliaca, che rappresenta il sito più idoneo all'impianto, in quanto è necessario sistemare l'organo nei pressi della vescica sia perché l'uretere del donatore è più corto, sia perché si ha la possibilità di usufruire dei grossi vasi della gamba (arteria e vena iliaca) per l'anastomosi con i vasi renali. Inoltre, la superficialità della sede d'impianto facilita sia il controllo post operatorio del rene sia l'esecuzione di eventuali biopsie.

Nella maggior parte dei casi i rene nativi, a differenza del trapianto di fegato, cuore e polmone, occupano la loro posizione d'origine utilizzando per un'eventuale secondo trapianto la fossa iliaca contro laterale. La nefrectomia, infatti e' controindicata in quanto oltre ad aumentare significativamente la morbilita' e la mortalita' operatoria e' raramente necessaria, ed e' indicata soltanto nei pazienti affetti da malattia policistica nei quali i reni possono raggiungere dimensioni tali da comprimere gli organi adiacenti oppure limitare lo spazio necessario per l'impianto del nuovo rene. Alcuni pazienti possono anche essere sottoposti al trapianto di due reni (doppio trapianto) e questo si verifica nel caso in cui gli organi provengano da donatori non ideali in relazione all'eta' (eta' superiore ai 60 anni) oppure in quei casi in cui la creatininemia risulti superiore a 2,5 mg/dl (24).

La maggior parte degli organi, una volta effettuate le anastomosi vascolari, riprendono quasi subito la loro funzione, tranne in quei rari casi in cui si verifica il fenomeno della "non-funzionalita' iniziale del rene" che prende il nome di necrosi tubulare. Questo fenomeno indica il danno, subito dall'organo durante la fase di prelievo o durante il periodo di conservazione del rene in soluzione fredda. Tuttavia la ripresa funzionale, dipende da numerosi fattori i quali possono essere associati al donatore, al ricevente, alla tecnica chirurgica ed ai tempi di ischemia calda e fredda. Quest'ultima rappresenta la metodica tradizionale di conservazione del rene espiantato e consiste nel preservare l'organo in ghiaccio fino al momento in cui il rene viene portato a temperatura ambiente per essere impiantato. Normalmente il tempo di ischemia fredda e' di 18-24 ore circa, e naturalmente piu' si riduce il tempo di conservazione del rene migliore e piu' rapida sara' la sua ripresa funzionale. Nel trapianto da vivente il tempo di ischemia fredda e' pari a zero, e questo rappresenta uno dei motivi per cui il trapianto da vivente, risulta piu' efficace rispetto al trapianto da donatore da cadavere (24).

TRAPIANTO DI RENE DA DONATORE VIVENTE

I risultati del trapianto di rene da donatore vivente sono migliori rispetto a quelli da donatore cadavere, in quanto il tempo di ischemia fredda e' nullo, vi e' una migliore compatibilita' genetica tra il donatore e il ricevente, ed e' possibile pianificare il momento dell'intervento. Inoltre il trapianto da vivente rispetto al trapianto da cadavere offre diversi benefici: rappresenta una valida risorsa per ridurre i tempi di lista d'attesa, offre un organo con un'ottima sopravvivenza al ricevente, offre la possibilita' di eseguire il trapianto anche prima di iniziare la terapia dialitica ed ha per il donatore un effetto psicologico positivo a lungo termine, in quanto e' consapevole di aver sollevato un proprio caro dalle sofferenze dialitiche.

La donazione da vivente e' regolata dalla legge n 458 del 26 giugno del 1967 secondo la quale il donatore deve avere raggiunto la maggiore eta' e la donazione deve avvenire spontaneamente in assenza di alcun compenso in denaro o di altra forma di costrizione (25). Per tale motivo la legge prevede che l'autorizzazione finale a tale tipo di intervento venga data da un magistrato che dovra' certificare la natura spontanea e gratuita della donazione. Il donatore vivente deve essere informato sugli eventuali rischi della procedura chirurgica e sulle potenziali complicanze post operatorie incluso il rischio di mortalita' che secondo le ultime statistiche e' comunque molto raro (0,02%) (24). In passato un certo numero di decessi era causato da embolia polmonare, che adesso viene prevenuta con una approfondita valutazione preoperatoria del rischio tromboembolico, la mobilitazione precoce e con la profilassi antibiotica.

Gli studi sulla popolazione dei donatori hanno dimostrato che la sopravvivenza a lungo termine dei donatori viventi e' perfino superiore a quella della popolazione generale, e questo si spiega dalla scelta per la donazione da vivente di persone sane che vengono selezionate adeguatamente e che dopo l'intervento vengono seguite con un regolare follow-up. Si stima, che

nel tempo il rischio di mortalità sia ulteriormente destinato a diminuire in quanto di recente molti centri Trapianto Americani per prelevare l'organo da donare utilizzano la tecnica della chirurgia laparoscopica mini-invasiva. Con tale procedura infatti i rischi chirurgici sono ancora più bassi e di conseguenza i donatori sono ancora più invogliati all'atto di donare. Pertanto è auspicabile potenziare questo tipo intervento in modo tale da raggiungere, anche in Italia, un rapporto di 1:1 tra il trapianto da vivente e quello da cadavere.

COMPLICANZE IMMUNOLOGICHE

Un trapianto d'organo tra individui geneticamente diversi appartenenti alla stessa specie (allograpianto), evolve inevitabilmente verso il rigetto dopo un periodo di tempo abbastanza breve, di circa 4-8 giorni. Il rigetto è la conseguenza della normale attività di difesa, operata dal sistema immunitario dell'individuo nei confronti di antigeni non self, che si realizza attraverso i meccanismi propri dell'immunità umorale, mediata da anticorpi prodotti dai linfociti B, e da quelli propri dell'immunità cellulare sostenuta dai linfociti T.

L'organo trapiantato infatti dopo poche ore dal trapianto appare infiltrato da linfociti e plasmacellule, entrambi responsabili della risposta immunologica contro il tessuto riconosciuto come estraneo. Il rischio di andare incontro al fenomeno del rigetto, che può talvolta ripetersi nello stesso paziente più volte, è maggiore nei primi giorni dopo il trapianto ma persiste, sebbene con una probabilità progressivamente inferiore, anche mesi dopo l'intervento (26).

Si distinguono 3 tipi di rigetto (27):

- **rigetto iperacuto**: si manifesta entro 48 ore dal trapianto e può portare alla distruzione dell'organo in poche ore. È secondario alla presenza nel ricevente di anticorpi diretti contro l'organo donato; tuttavia lo studio della compatibilità prima del trapianto lo rende un'evenienza eccezionale.

- **rigetto acuto**: insorge entro i primi tre mesi dall'intervento anche se potenzialmente può svilupparsi in qualsiasi momento. Questo tipo di rigetto determina una grave nefrite interstiziale acuta, con edema, vasculite e infiltrato linfomonocitario, causando un'insufficienza renale acuta, potenzialmente reversibile. La diagnosi viene eseguita mediante esame istologico su prelievo biotico, e il trattamento è rappresentato

dalla terapia steroidea ad alta dosi e, nei casi refrattari, dalla somministrazione di anticorpi monoclonali anti-linfocitari.

- **rigetto cronico**: e' una condizione caratterizzata da un danno multifattoriale a carico delle arterie, dei tubuli, dell'interstizio e dei glomeruli renali.

L'insorgenza del rigetto viene segnalata dalla comparsa della febbre, dalla dolorabilita' e dalle tumefazione dell'organo trapiantato, e dai segni dell'insufficienza renale quali l'ipertensione, l'aumento del peso corporeo, la proteinuria e la presenza di linfociti e cellule tubulari nel sedimento urinario. In alcuni casi puo' accadere che il rigetto si verifichi in assenza di alcun sintomo, per cui il rigetto viene sospettato soltanto perche' ai controlli di laboratorio durante il follow-up si trova osserva una diminuzione della funzionalita' renale. Il trattamento del rigetto consiste solitamente nell'intensificazione della terapia immunosoppressiva; se invece avviene la perdita del graft la terapia farmacologica viene sospesa e il paziente torna al trattamento dialitico in attesa di essere sottoposto ad un nuovo trapianto. Inoltre se alla reazione di rigetto e alla sospensione dei farmaci immunosoppressori fa seguito la comparsa di ematuria, rammollimento dell'organo e febbre, si rende necessaria anche la nefrectomia del rene trapiantato.

Tuttavia la percentuale di successo dei trapianti di rene e' oggi molto alta, e si assiste ad una sopravvivenza dell'organo ad un anno dal trapianto dell'85% - 90% nei trapianti da cadavere, e del 90% - 95% nei trapianti da vivente (3)

I FARMACI IMMUNOSOPPRESSORI

Il gold standard per la sopravvivenza di un allotrapianto è legato alla capacità di prevenire o far regredire la naturale reazione del sistema immunitario nei confronti di antigeni riconosciuti come estranei. Molteplici strategie in grado di interferire con la risposta immunitaria del ricevente sono state sperimentate fino ad oggi. L'obiettivo finale è quello di ottenere l'accettazione permanente del trapianto senza la necessità di dover ricorrere al trattamento cronico con farmaci immunosoppressori: si cerca cioè di perseguire la cosiddetta "tolleranza immunologica". L'immunomanipolazione rappresenta un settore di ricerca interessante che riguarda l'induzione di una tolleranza immunitaria permanente mediante il trasferimento di cellule APC da donatore a ricevente. Le APC, pervenute nel ricevente, proliferano fino a creare una popolazione linfocitaria mista donatore-ricevente (chimerismo) che sembra in grado di innescare una serie di meccanismi che potrebbero portare all'accettazione permanente del graft eliminando la necessità del trattamento immunosoppressivo (28). Anche se l'immunomanipolazione è oggi un settore di ricerca estremamente promettente, l'immunosoppressione attraverso farmaci rappresenta attualmente la procedura più comunemente utilizzata per prevenire il rigetto nel paziente trapiantato. Non esistono schemi fissi di terapia ed ogni Centro Trapianti utilizza la propria esperienza cercando, nel rispetto di Linee Guida Internazionali, di personalizzare il trattamento per ogni singolo paziente, valutando tossicità e co-presenza di fattori di rischio per ridurre al minimo le complicanze della terapia immunosoppressiva stessa. I principi di ordine generale a cui è necessario attenersi nel programmare una terapia immunosoppressiva prevedono di articolare la terapia in due fasi: una prima fase detta di *induzione*, effettuata nelle prime due settimane dal trapianto che ha come obiettivo quello di sopprimere l'immunità cellulare lasciando intatta la risposta immunitaria

umorale del ricevente, ed una seconda fase detta di *mantenimento*, che ha l'obiettivo di evitare l'insorgenza di episodi acuti di rigetto in tempi successivi attraverso l'utilizzo di farmaci in differenti combinazioni.

La Terapia di Induzione, si basa sull'uso di varie formulazioni anticorpali disponibili in commercio. Queste includono, per esempio, due sieri policlonali anti-linfocitari, due tipi di anticorpi monoclonali contro il r per l'IL2 e immunoglobuline monoclonali dirette contro le cellule erpimentiil CD3.

I farmaci impiegati invece per la terapia di mantenimento icludono gli **corticosteroidi**, la **Ciclosporina** (Neoral), il **Tacrolimus** (Prograf), il **Mofetil Micofenolato** (Cell Cept), **l'Aziatioprina** (Azatioprina) il **Sirolimus** (Rapamune), **l'Everolimus** (Certican), e il **Micofenolato Sodico** (Myfortic) Le dosi di questi farmaci vengono monitorate nel tempo e, se necessario, modificate fino al raggiungimento dei livelli ematici ottimali per il paziente. L'obiettivo e' infatti quello di raggiungere un compromesso ottimale tra un'immunosoppressione sufficiente a prevenire gli episodi di rigetto, e la comparsa di eventi avversi.

I **Corticosteroidi** hanno un meccanismo d'azione molto complesso in quanto agiscono sulla risposta immunitaria a piu' livelli. In particolare, questi farmaci agiscono sul reclutamento e l'attivazione dei linfociti T, inibendo la produzione dell'IL-1, IL-2 IL-6. Questi farmaci vengono solitamente somministrati in dose elevata (da 2 a 20 mg/kg) al momento del trapianto e poi ridotti gradualmente fino a una dose di mantenimento. La sospensione dei corticosteroidi e' possibile solo quando si fa uso di protocolli terapeutici con piu' farmaci associati. Viceversa in caso di rigetto acuto la dose viene notevolmente aumentata nonostante il rischio di vedere aumentati gli effetti collaterali secondari a-questi farmaci. Tra gli effetti collaterali ricordiamo: l'aumentato rischio di infezioni, l'osteoporosi e l'osteonecrosi, l'ipertensione arteriosa, l'ipervolemia e gli edemi, le alterazioni del SNC, e i disturbi metabolici.

La **Ciclosporina** e il **Tacrolimus** sono farmaci *inibitori della calcineurina*, che agiscono impedendo la differenziazione dei linfociti T citotossici, la produzione e il rilascio delle citochine, in particolare dell'IL-2 diretta contro gli antigeni dell'organo trapiantato. L'azione immunosoppressoria della **Ciclosporina** si esplica attenuando la reattività dei linfociti T. Questo farmaco pur essendo un potente immunosoppressore, a differenza degli altri farmaci anti rigetto, presenta il grande vantaggio di mantenere integro lo sviluppo delle altre cellule del midollo osseo, e quindi non provoca anemia o leucopenia ed eccessiva riduzione delle difese immunitarie. Tuttavia, il farmaco presenta, una discreta serie di altri effetti collaterali, tra i quali spicca la sua elevata nefrotossicità dose-dipendente (29). Infatti è necessario controllare periodicamente le concentrazioni del farmaco nel sangue, in modo da riportare i livelli plasmatici entro valori di sicurezza, in quanto a lungo termine la Ciclosporina può portare allo sviluppo di fibrosi interstiziale e danno glomerulare che può evolvere verso l'insufficienza renale cronica. Altri effetti collaterali della Ciclosporina possono essere: la presenza di lievi tremori, l'ipertensione arteriosa, l'iperglicemia, la colesterolemia, la cefalea, la gotta ecc.

Il **Tracrolimus** prodotto dallo *Streptomyces tsukubaensis*, è un immunosoppressore dall'azione simile alla Ciclosporina con effetti collaterali dose-dipendenti e pertanto la concentrazione del farmaco nel sangue deve essere monitorata con la stessa frequenza. Esso rappresenta la vera alternativa alla ciclosporina è da 10 a 100 volte più potente nell'inibire la risposta immunitaria, anche se recenti studi multicentrici effettuati in Europa e negli Stati Uniti non hanno indicato differenze significative tra i due farmaci in termini di sopravvivenza sia del graft che dei pazienti. Gli effetti collaterali più comuni sono: neurotossicità, nefrotossicità, ipertensione arteriosa, elevati livelli di potassio, iperglicemia, predisposizione all'infezioni e tumori ecc. (30).

Il **Micofenolato Mofetile** e l'**Azatioprina** sono farmaci *inibitori della sintesi del DNA*. Il **Micofenolato Mofetile** (MMF) derivato dal fungo *Penicillium stoloniferum*, appartiene alla categoria dei farmaci citostatici, cioè che agiscono inibendo la moltiplicazione delle cellule del midollo osseo, (i globuli bianchi, i globuli rossi e le piastrine) (31). In particolare il micofenolato inibisce l'IMP deidrogenasi, l'enzima che controlla la velocità di sintesi della guanina monofosfato usata dai linfociti T e B in fase proliferativa. La tossicità del farmaco è prevalentemente di tipo midollare, con neutropenia, trombocitopenia ed anemie. Inoltre frequenti sono i disturbi gastrointestinali come le gastriti, crampi addominali, nausea, anoressia ed ulcerazioni con sanguinamenti digestivi. Il MMF è un farmaco utilizzato in uno schema che prevede la combinazione di 3 farmaci immunosoppressori tra cui un inibitore della calcineurina (Ciclosporina o Tacrolimus) e Steroidi. Il **Micofenolato sodico** è un farmaco che permette il rilascio dell'acido micofenolico all'interno dell'intestino tenue. Questa formulazione è consigliata quando si vuole ridurre l'incidenza degli effetti collaterali soprattutto a carico dell'apparato gastroenterico.

L'**Azatioprina** ha un meccanismo d'azione simile a quello del Mofetil micofenolato. Esso infatti interferisce con la sintesi del DNA ed RNA dei linfociti T e B inibendo la loro differenziazione e proliferazione nel torrente circolatorio (32). Attualmente questo farmaco è poco utilizzato in quanto può determinare gravi effetti collaterali come le neoplasie, la mielosoppressione, la leucopenia, le infezioni gravi, l'epatotossicità, ematomi, sanguinamenti, e le cistiti emorragiche. Per tale motivo l'utilizzo di questo farmaco prevede nel paziente il controllo periodico dell'emocromo e delle piastrine oltre ad un monitoraggio finalizzato alla identificazione precoce dell'esordio di manifestazioni cliniche.

Il **Sirolimus** prodotto da *Streptomyces hygroscopicus*, ha un meccanismo d'azione diverso rispetto agli inibitori della calcineurina. Esso infatti inibisce la proliferazione e

l'attivazione delle cellule T e B in uno stadio successivo rispetto a quello della Ciclosporina e del Tacrolimus (33). Questo farmaco può essere utilizzato in associazione con altri farmaci quali la Ciclosporina, il Tacrolimus e il Micofenolato, e spesso viene utilizzato quando altre terapie non hanno dato risultati positivi, o quando si vuole utilizzare un regime terapeutico privo di cortisone (ad esempio Sirolimus e Ciclosporina, o Tacrolimus e Micofenolato).

L'Everolimus è un farmaco anch'esso indicato nella profilassi del rigetto d'organo, soprattutto se associato con la Ciclosporina e i Corticosteroidi. Esso inibisce la proliferazione dei linfociti T e B, dei fibroblasti e delle cellule endoteliali (33).

FOLLOW-UP DEL PAZIENTE TRAPIANTATO DI RENE

I tempi e il grado di recupero dopo un intervento di trapianto di rene variano da paziente a paziente. Nelle prime ore successive al trapianto e' necessario accertare il corretto funzionamento del nuovo organo, espressa dalla creatininemia sierica e dalla clearance della creatinina, e sorvegliare la comparsa di segni di rigetto. Nonostante la profilassi, infatti, con i farmaci immunosoppressori, il ricevente puo' andare incontro ad uno o piu' episodi di rigetto che clinicamente viene preannunciato da malessere generale e dalla presenza di febbre, tachicardia, ipertensione, aumento di peso, e dal rigonfiamento dell'organo trapiantato.

La sopravvivenza a lungo termine dell'organo trapiantato dipende oltre che dai "fattori immunologici" anche da quelli cosiddetti "non immunologici" quali le complicanze vascolari, urologiche ed infettive che generalmente si manifestano nel post-trapianto e che rappresentano la seconda causa di morte in questi pazienti.

Nel 2004 la Societa' Italiana di Nefrologia (SIN) (34) ha approvato le Linee guida Italiane adattate a quelle dell'American Society of Transplantation del 2000 (35) sulla sorveglianza ambulatoriale del paziente trapiantato di rene pag 474 con l'obbiettivo di ottimizzare il livello di sorveglianza e di cura del paziente e di assicurare una maggiore sopravvivenza al lungo termine dell'organo trapiantato. I principali aspetti della sorveglianza sono stati suddivisi in 4 sezioni fondamentali:

- 1) la funzionalita' dell'organo trapiantato e l'efficacia della terapia immunosoppressiva;
- 2) la patologia infettiva;
- 3) la patologia cardiovascolare;
- 4) la patologia neoplastica.

Relativamente al monitoraggio della funzionalità organo del trapiantato e all'efficacia della terapia immunosoppressiva, la frequenza ottimale dei controlli clinici si stabilisce sulla base dei singoli pazienti. Generalmente si consigliano dei controlli ambulatoriali presso il centro trapianti d'appartenenza, uno o due volte la settimana nel primo mese dopo il trapianto, e successivamente a cadenza settimanale tra il secondo e terzo mese. In questa fase precoce è stato dimostrato che il rischio di rigetto acuto e di perdita dell'organo è massimo a causa dell'elevato dosaggio della terapia immunosoppressiva e delle complicanze infettive. Successivamente dal 4 al 12 mese i controlli avranno cadenza mensile e saranno mirati principalmente ad identificare l'eventuale insorgenza di processi infettivi.

COMPLICANZE INFETTIVE

Le complicanze infettive costituiscono un'importante limitazione al completo successo del trapianto rappresentando la causa più importante di morbidità e mortalità tanto che gran parte della letteratura recente é dedicata all'analisi di tali complicanze.

L'incidenza di infezioni nei pazienti trapiantati in relazione al tipo di trapianto varia tra i diversi centri trapianto anche se si stima che circa 80% dei pazienti sottoposti a regime immunosoppressivo sviluppi almeno un episodio infettivo dopo il trapianto: 52% infezione batterica, nel 33% virale e nel 15% fungina (36). Negli anni alla progressiva riduzione dell'incidenza del rigetto acuto ha fatto seguito un significativo incremento della patologia infettiva, in particolare delle malattie associate a virus latenti (37). Lo stato immune del ricevente e l'intensita' della terapia immunosoppressiva infatti condizionano l'incidenza e la gravita' di tali infezioni. La frequenza e il tipo di infezione varia in relazione a diversi fattori quali: il tipo di trapianto, fattori di rischio specifici di ciascun paziente, il periodo di ospedalizzazione, la struttura ospedaliera e la comunita' di appartenenza. Il periodo d'insorgenza delle infezioni rispecchia invece le modificazioni temporali dei fattori di rischio, soprattutto il tipo di immunosoppressione a cui il paziente e' sottoposto che e' massimo nel primo periodo dopo il trapianto e poi diminuisce progressivamente.

TIMING DELLE PRINCIPALI INFEZIONI DOPO TRAPIANTO

Il rischio infettivo nei pazienti sottoposti a trapianto d'organo solido varia nel tempo. Già dai primi studi effettuati su questi pazienti è stato osservato come le differenti patologie infettive occorrenti seguissero una linea temporale stereotipata e spesso predicibile. Approssimativamente dal 50% al 75% dei trapiantati sviluppa una complicanza infettiva nel primo anno dopo il trapianto e le infezioni più temibili per la vita del paziente tendono a verificarsi con maggior frequenza nei primi 3-4 mesi post-trapianto. Questo è il periodo in cui tutti i fattori di rischio di infezione possono essere contemporaneamente presenti: la malattia di base del paziente può essere ancora in grado di sortire effetti, l'intervento chirurgico e la degenza nelle terapie intensive nel post-intervento sono fattori favorevoli rilevanti, la terapia immunosoppressiva ha in questo periodo la sua massima espressione ed infine possono insorgere reazioni di rigetto acuto. In seguito incidenza, morbilità e mortalità da complicanze infettive tendono a ridursi; comunque il rischio infettivo è sempre presente e molto spesso a periodi differenti corrispondono eziologie infettive differenti ed oramai ben note. In generale in base alla terapia immunosoppressiva è possibile dividere il rischio infettivo in tre periodi: 1) il primo mese dopo il trapianto; 2) da 1 a 6 mesi dopo il trapianto; 3) dopo un anno dal trapianto.

Le infezioni che si realizzano nei primi 30 giorni dal trapianto (**periodo precoce**) sono nel 95% dei casi le classiche infezioni post-operatorie associate al sito di intervento e sostenute dai microrganismi presenti sia nel ricevente che nell'organo trapiantato. Comunemente queste infezioni sono sostenute da batteri e da *Candida* spp. e sono rappresentate da: infezioni della ferita chirurgica, polmoniti, infezioni delle vie urinarie, setticemie sostenute da infezioni di *devices*, ed infezioni intra-addominali secondarie a complicanze anastomotiche. Molte delle infezioni post-operatorie sono localizzate al sito d'impianto del graft: è oramai noto che i

pazienti con trapianto di rene sviluppano frequentemente infezioni delle vie urinarie; trapiantati di fegato, pancreas ed intestino vanno incontro ad ascessi intra-addominali; infine trapiantati di cuore o polmoni possono sviluppare mediastiniti, bronchiti o polmoniti. Nel rimanente 5% dei casi invece le infezioni sono sostenute da microrganismi presenti nel donatore o nel ricevente prima del trapianto e comprendono: riattivazioni di virus latenti; batteriemie o fungemie misconosciute a carico di donatore e/o ricevente che possono portare alla colonizzazione del graft, in particolar modo a livello delle anastomosi vascolari, provocando la formazione di aneurismi micotici ed eventualmente la deiscenza delle anastomosi.

Il periodo che va da 1 a 6 mesi dopo il trapianto (**periodo intermedio**) vedeva in passato occorrere con maggior frequenza le “classiche” infezioni opportunistiche; l’introduzione di profilassi efficaci ha causato la modificazione del pattern “classico” prevenendo generalmente la comparsa di infezioni da virus erpetici, infezioni delle vie urinarie ed altre infezioni opportunistiche (*Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii*, *Nocardia* spp. sulfametossazolo-sensibili), in favore di infezioni da virus “immunomodulanti” spesso acquisite a partire dal donatore o latenti nel ricevente e il cui periodo di incubazione copre in genere il periodo precoce. Tra le infezioni occorrenti con maggior frequenza durante il periodo intermedio si ricordano inoltre micosi endemiche, aspergillosi, criptococcosi, strongiloidiasi e infezioni da virus cosiddetti “emergenti” quali poliomavirus (BK e JC virus) ed adenovirus (38).

Nell’80% dei pazienti sottoposti a trapianto d’organo solido il rischio infettivo tende a diminuire dopo i 6 mesi dall’intervento (**periodo tardivo**) poiché in soggetti con buona funzione del graft si tende generalmente a diminuire la posologia della terapia immunosoppressiva (39). Ciò che si nota con maggiore frequenza in questi pazienti è la diminuzione dell’occorrenza di infezioni opportunistiche, mentre il rischio di sviluppare infezioni comunitarie da batteri e virus respiratori rimane maggiore rispetto alla popolazione generale. In un 10-15% di pazienti la

cronicizzazione di infezioni virali da HBV, HCV, CMV o HPV può provocare danneggiamento del graft, complicanze a carico di altri organi (retinite da CMV) od aumentata incidenza di neoplasie maligne (HCC, PTLD o carcinoma a cellule squamose). Infine un 5-10% dei pazienti trapiantati possono appartenere alla categoria dei pazienti in cui l'occorrenza di rigetto cronico o di ripetuti episodi di rigetto acuto porta ad una riduzione della funzionalità del graft ed alla necessità di mantenere alti i livelli di terapia immunosoppressiva. Questi pazienti rimangono ad alto rischio per infezioni opportunistiche spesso sostenute da microrganismi inusuali (*Listeria monocytogenes*, *Nocardia* spp., *Rhodococcus* spp., zigomiceti). Il rischio infettivo cronicamente aumentato e la diminuita funzionalità del graft rendono necessaria la sorveglianza accurata ed il mantenimento di un regime profilattico *long life* con cotrimossazolo ed eventualmente fluconazolo in questo sottogruppo di pazienti. Nel corso degli anni questa stessa “*timeline*” ha subito sostanziali modificazioni dovute all'introduzione di nuovi farmaci immunosoppressori, a profilassi antimicrobiche efficaci effettuate ormai di routine in tutti i pazienti sottoposti a trapianto, al riconoscimento di sindromi cliniche precedentemente sconosciute (nefropatia da *poliomavirus BKV*), ai numerosi test microbiologici innovativi sviluppatasi nel campo della diagnostica molecolare ed infine al progressivo aumento della sopravvivenza del graft nel tempo. La successione temporale delle infezioni per ogni singolo paziente tende a modificarsi rispetto al pattern generico in relazione al tipo di graft, all'occorrenza di episodi di rigetto ed alle variazioni della terapia immunosoppressiva. La presenza di una “*timetable*” ben definita quale imprescindibile strumento all'interno del percorso diagnostico-terapeutico delle complicanze infettive del paziente sottoposto a trapianto d'organo solido è funzionale ai seguenti scopi (Tabella 2):

a) guida la diagnosi differenziale tra differenti sindromi infettive all'interno di un preciso intervallo di tempo post-trapianto;

b) permette osservazioni di ordine epidemiologico: il verificarsi di infezioni che costituiscono “eccezioni” alla successione temporale “classica” dipende per un’eccessiva esposizione ambientale.

c) costituisce la base su cui impostare strategie di controllo e terapia delle complicanze infettive del paziente trapiantato.

TIPI DI INFEZIONI

I siti primari di infezione nei pazienti sottoposti a trapianto di rene sono le vie urinarie, le vie respiratorie, la cavità intra-addominale e la cute (40) (Tabella 3).

La maggior parte delle infezioni **batteriche** insorge generalmente nei primi mesi dopo il trapianto, interessando il 47% dei pazienti sottoposti a trapianto di rene, il 35% dei pazienti sottoposti a trapianto di pancreas (41-45). Le infezioni **fungine** insorgono nel 5-20% dei pazienti sottoposti a trapianto di rene. Le forme più comuni di infezione fungina opportunistica sono sostenute da *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Cryptococcus neoformans* e micosi endemiche (46-47). Le infezioni **virali** in pazienti trapiantati possono assumere molteplici forme che vanno da infezioni asintomatiche, diagnosticate solo sulla base di indagini sierologiche e soprattutto di amplificazione genomica (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), ad infezioni fulminanti o malattie invasive gravate da elevati tassi di mortalità. Le infezioni virali possono essere causate da virus latenti, da agenti virali trasmessi da donatore a ricevente al momento del trapianto o da microrganismi presenti nell'ambiente al quale il paziente immunodepresso è quotidianamente esposto (48-49).

Le **infezioni batteriche** rappresentano le infezioni più comuni, e tra queste quelle urinarie sono le più frequenti, causate principalmente da batteri Gram negativi e tra questi *Escherichia coli* risulta il batterio maggiormente isolato. Oltre alle infezioni urinarie, le infezioni batteriche possono includere: le infezioni da ferita chirurgica, le infezioni da catetere di drenaggio chirurgico, le polmoniti, la batteriemia ecc. Si tratta generalmente di infezioni nosocomiali, per cui una profilassi antibiotica preoperatoria ed una meticolosa assistenza post-operatoria sono determinanti per la riduzione del rischio di infezioni batteriche.

La scelta terapeutica dovrebbe essere sempre effettuata sulla base dell'isolamento colturale del batterio dai vari campioni biologici esaminati, quali: il sangue, le urine, la bile, il BAL, i CVC, le biopsie tissutali ecc. e sulla base dell'antibiogramma ottenuto. Inoltre i criteri di scelta dell'antibiotico devono prendere in considerazione alcuni parametri fondamentali come l'efficacia, la tollerabilità, e le eventuali interferenze farmacologiche con la terapia immunosoppressiva, che generalmente non è controindicata. Talvolta le infezioni batteriche possono anche compromettere la vita del paziente, dal momento che oggi si isolano sempre più frequentemente batteri multi-resistenti ai comuni antibiotici utilizzati in terapia, (ad esempio alcuni ceppi di *Klebsiella pneumoniae*). Altri batteri Gram Negativi temibili per il paziente trapiantato sono l'*Acinetobacter baumannii*, lo *Pseudomonas aeruginosa*, e i batteri Gram positivi come gli *Stafilococchi aurei*, e gli *Enterococchi*. (41-45).

Anche la sorveglianza della tubercolosi richiede una particolare attenzione poiché il rischio di infezione in questi pazienti è considerato da 7 a 50 volte maggiore rispetto alla popolazione generale, associata ad una elevata mortalità. L'infezione da *Mycobacterium Tuberculosis* infatti, si può manifestare nel primo anno dopo il trapianto in seguito alla riattivazione di vecchi focolai e pertanto nei pazienti considerati a rischio d'infezione tubercolare sia nel pre trapianto che nel post trapianto, si consiglia di eseguire una profilassi con Isoniazide e Vitamina B6, per 6-9 mesi dopo il trapianto.

Le infezioni fungine insorgono nel 5-20% dei pazienti, con un'incidenza variabile a seconda del tipo di trapianto (46, 47). Le forme più comuni di infezione fungina sono quelle sostenute da *Candida albicans*, *Aspergillus*, *Cryptococcus neoformans* e micosi endemiche provocate da *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* e *Blastomyces dermatitis*. Inoltre, tra le infezioni fungine, particolare attenzione richiede il monitoraggio dell'infezione da

Pneumocystis carinii che nel paziente immunocompromesso può causare la morte o comunque un alto tasso di morbilità, stimato nell'ordine del 5-15% (50). Data l'alta incidenza di queste infezioni, alcuni centri trapianto effettuano la profilassi durante le prime settimane dopo il trapianto con trimethoprin-sulfamethossazolo che peraltro è provvista di effetti collaterali di bassa rilevanza.

Oltre alle infezioni batteriche e fungine il trapianto d'organo e la terapia immunosoppressiva espongono il paziente al rischio di numerose **infezioni virali**. Alcune di queste sono il risultato di epidemie comunitarie (influenza, adenovirus), altre possono essere trasmesse con l'organo trapiantato (CMV, EBV), ed infine altre ancora possono essere il risultato di una riattivazione di infezioni latenti dovute alla terapia immunosoppressiva (CMV, EBV, Zoster, Herpes simplex 1-2, Poliomavirus BKV e JC.) (51). A tal proposito negli ultimi dieci anni particolare attenzione è stata rivolta alla nefropatia interstiziale associata all'infezione del virus BK (PVAN) che ad oggi rappresenta una delle cause emergenti di disfunzione renale, con un aumento graduale nei tassi di prevalenza che vanno da valori del 1% nel 1995 a valori del 5% nel 2001, fino a raggiungere stime d'incidenza del 8% circa negli anni successivi al 2002-2003 per poi attestarsi al 10% negli ultimi anni. Tale percentuale risulta più bassa nei centri che hanno attivato programmi di sorveglianza e di intervento nei confronti di tale infezione.

INFEZIONI DA CITOMEGALOVIRUS

Il citomegalovirus (CMV) è il patogeno virale che più comunemente infetta pazienti sottoposti a trapianto d'organo solido, con effetti significativi sulla sopravvivenza del graft e

dell'individuo. Alcuni autori riportano un'incidenza estremamente elevata (fino al 90%) di infezione da CMV post-trapianto diagnosticata sulla base di sieroconversione o evidenza di antigeni virali e/o replicazione genomica su siero in presenza o meno di manifestazioni cliniche di malattia.

L'infezione da CMV può essere *primaria*, derivante da trasmissione da donatore (D) sieropositivo (+) affetto da infezione latente a ricevente (R) sieronegativo (-) (D+/R-): tale tipo di infezione è in grado di determinare i tassi più elevati di mortalità e perdita del graft; oppure può derivare da evenienze relativamente più "benigne" quali: *super-infezione*, quando il graft da donatore sieropositivo viene impiantato su ricevente a sua volta sieropositivo (D+/R+), e *riattivazione* del virus nel ricevente sieropositivo indipendentemente dallo status del donatore (D + o - /R+) (52).

In generale si distinguono: *infezioni latenti*, quando il virus è presente nelle cellule dell'ospite in assenza di evidente replicazione virale; *infezioni attive*, quando si evidenzia replicazione virale in circolo e/o nei tessuti del paziente; *malattia conclamata*, quando si realizzano manifestazioni cliniche in presenza di infezione attiva (53). Dal punto di vista sintomatologico l'infezione nel paziente può presentarsi in varie forme: *infezione asintomatica* diagnosticata per isolata dimostrazione di replica virale su differenti campioni biologici, *infezione sintomatica* in cui il CMV è il solo agente etiologico, con manifestazioni differenti a seconda dell'organo interessato o manifestazioni sistemiche in caso di malattia disseminata.

Inoltre gli effetti dell'infezione da CMV possono essere distinti in *diretti ed indiretti*. Gli effetti *diretti*, la cui incidenza cresce proporzionalmente con l'incremento della carica virale, consistono nella malattia conclamata da CMV che si presenta alternativamente come **sindrome mononucleosica da CMV**, caratterizzata da segni e sintomi simil-mononucleosici quali febbre, mialgie, malessere generale, neutropenia, trombocitopenia e linfocitosi, o come **malattia**

d'organo quali polmonite, emorragie del tratto gastrointestinale superiore od inferiore in seguito al prodursi di ulcere CMV correlate, pancreatite, epatite od in casi più gravi insufficienza multi-organo (*Multiple Organ Failure*, MOF) (54). Gli effetti *indiretti* dell'infezione da CMV al contrario, si estrinsecano più comunemente nei periodi di lenta replicazione virale e rappresentano il risultato della risposta immunitaria dell'ospite al virus immunomodulante. La diagnosi dell'infezione da CMV si basa ormai comunemente sull'identificazione di antigeni virali, in particolar modo la proteina strutturale pp65, e sulla ricerca quali e quantitativa del genoma virale (CMV-DNA) attraverso esami di amplificazione molecolare (PCR), utilizzati anche per il follow-up dei pazienti infetti (55).

INFEZIONI DA POLYOMAVIRUS

Il *Polyomavirus hominis* di tipo 1, conosciuto anche come virus BK (BKV) dalle iniziali del paziente nel quale e' stato isolato per la prima volta nel 1971, e' un virus umano con DNA a doppio filamento e per l'elevata omologia genomica esso e' molto simile ad un altro virus appartenente alla stessa famiglia dei Poliomavirus denominato JCV. Entrambi i virus possono essere identificati e differenziati l'uno dall'altro effettuando prove sierologiche mediante anticorpi specifici, ma soltanto il BKV e' associato alla nefropatia interstiziale (BKV associated nephropathy BKVAN), mentre il JCV e' responsabile di encefalopatie a carico del SNC (56). I Poliomavirus contengono un genoma costituito da 5000 coppie di basi di DNA a doppio filamento codificanti per tre proteine del capsido virale chiamate rispettivamente VP1, VP2 e VP3. La proteina VP1 e' localizzata nella parte piu' esterna del virione ed e' l'unica proteina che interagisce con il recettore cellulare.

Il BK virus e' un poliomavirus ubiquitario, in grado di infettare fino al 70-90% della popolazione immunocompetente. Numerosi studi hanno dimostrato che piu' del 70% della popolazione adulta possiede anticorpi per il BKV prodotti dopo aver contratto un'infezione primaria durante la prima infanzia. In seguito a tale infezione, il virus rimane latente nelle cellule del tratto urogenitale senza manifestare alcuna malattia, e soltanto in seguito a situazioni di debilitazione dell'organismo o in casi di compromissione del sistema immunitario il virus puo' riattivarsi dando luogo ad un'intensa replicazione virale. La replicazione attiva del virus e' generalmente asintomatica, occasionalmente sono stati segnalati casi di cistite emorragica, stenosi uretrale e vasculopatie, mentre la BKVAN rappresenta la causa piu' importante di disfunzione renale dopo il trapianto (57). La maggior parte dei casi di BKVAN si presenta entro il primo anno dopo il trapianto, e piu' raramente tra il secondo e il quinto anno, e tale infezione

e' stata correlata con la riduzione dei tassi d'incidenza di rigetto acuto in seguito all'utilizzo dei potenti farmaci immunosoppressori.

L'aumento di prevalenza di BKVAN, osservata negli ultimi anni, e' dovuta alla aumentata conoscenza della malattia, che fino agli anni 90 era ancora sconosciuta dal momento che non era possibile isolare il virus. Da allora, grazie alla disponibilita' di strumenti diagnostici aggiornati ed alla conoscenza della malattia da parte dei medici si e' giunti ad eseguire diagnosi corrette e tempestive. Di conseguenza, oggi e' possibile stabilire con certezza la reale prevalenza di questa infezione che ha superato di gran lunga la prevalenza del rigetto acuto nei trapiantati; infatti si e' visto che nell'anno 2003 la prevalenza di BKVAN era di circa il 20% mentre la prevalenza di rigetto acuto era del 13% (58).

La patogenesi della BKVAN non e' ancora del tutto conosciuta, sebbene oggi appare sempre piu' chiaro come lo sviluppo della malattia richieda l'azione sinergica di molteplici fattori di rischio, tra i quali riveste un ruolo preminente l'intensa terapia immunosoppressiva antirigetto a cui il paziente trapiantato di rene e' sottoposto nel primo anno dopo il trapianto. Oltre ai farmaci immunosoppressori, e' possibile individuare altri fattori di rischio che contribuiscono alla patogenesi della BKVAN che sono:

- 1) le caratteristiche del paziente;
- 2) le caratteristiche dell'organo trapiantato;
- 3) le caratteristiche del virus.

1) Tra i fattori legati al paziente, e' stato documentato un aumentato rischio di BKVAN in soggetti di sesso maschile, di eta' avanzata, di razza caucasica, e con diabete. (59). Un'ulteriore fattore di rischio potrebbe essere rappresentato dalla sieronegativita' al BKV del ricevente al momento del trapianto. Infatti secondo alcuni studi compiuti su casistiche pediatriche, e' emerso come la sieronegativita' al BKV del ricevente, sia associata ad un aumentato rischio di infezione

attiva da BKV, in seguito al mancato controllo dell'attivazione del virus da parte del sistema immunitario (4). Contrariamente a queste ipotesi, altri studi, eseguiti su pazienti adulti sieropositivi al BKV, documentano come la presenza di anticorpi neutralizzanti il BKV non risultano essere in grado di proteggere i pazienti dalla riattivazione virale e dallo sviluppo della BKVAN (60)

2) L'ipotesi che fattori legati all'organo trapiantato possano intervenire nella patogenesi della BKVAN sono suggeriti dalle sporadiche osservazioni di BKVAN interessanti i reni nativi di pazienti che ricevono un trapianto di organo diverso dal rene. In particolare, la presenza di incompatibilita' HLA (rigetto acuto) o di lesioni tissutali del graft conseguenti ad esempio alla procedura di trapianto potrebbero contribuire a creare un microambiente permissivo alla replicazione virale, anche se il ruolo dei singoli fattori nello sviluppo di BKVAN appare controverso.

3) Infine alcune caratteristiche legate al virus potrebbero essere rappresentate dalle mutazioni della sequenza genomica del virus che codificano per alcune proteine virali necessarie per il riconoscimento da parte dei linfociti T del sistema immunitario.

I potenziali fattori di rischio che contribuiscono alla patogenesi del BKV appaiono dunque numerosi e non del tutto chiari. Tuttavia risulta evidente come la presenza di un'intensa terapia immunosoppressiva rappresenti il fattore di rischio piu' importante per lo sviluppo della nefropatia interstiziale. Inoltre sebbene in passato si ritenesse che la comparsa di BKVAN fosse associata con l'impiego di protocolli con piu' farmaci immunosoppressori quali il Tacrolimus, il Mofeti Micofenolato e i Corticosteroidi, oggi, si e' giunti alla conclusione che sia lo stato globale di una eccessiva immunosoppressione, piuttosto che l'uso dei singoli farmaci a determinare l'aumento del rischio di PVAN come dimostrato dall'osservazione di casi di BKVAN in pazienti trattati con regimi immunosoppressivi diversi da questi farmaci (61).

La diagnosi virologica di PVAN viene effettuata tramite la ricerca del DNA virale mediante PCR quantitativa nelle urine e nel plasma. Il test di screening sulle urine è determinante per escludere la presenza di PVAN, data la sua alta sensibilità, ma poiché la sua positività ha un valore predittivo molto basso, pari a circa il 20%, in quanto possono esistere quadri di replicazione virale transitoria, il test viene considerato autolimitante. Sono quindi necessari test aggiuntivi di riferimento come la ricerca del BKV DNA nel plasma, valutata mediante PCR quantitativa, che ha una sensibilità del 100% ed una predittività positiva del 83%. (57). A questo proposito, sono stati identificati dei valori soglia di BKV plasmatico ≥ 10.000 copie/ml che se persistenti, sono altamente indicativi di una BKVAN in atto. Un ulteriore test di screening per identificare la presenza di replicazione virale a livello urinario comprende lo studio citologico su sedimento urinario, ovvero la ricerca delle cellule di sfaldamento dei tubuli renali contenenti inclusioni virali (4).

Infine un test aggiuntivo per la conferma di un sospetto di BKVAN è la biopsia renale che al momento è considerata l'unico strumento idoneo a porre diagnosi di certezza di nefropatia interstiziale da BKV. La biopsia renale si basa sulla identificazione delle alterazioni citologiche indotte dal virus a livello delle cellule dell'epitelio tubulare renale, e sulla conferma della presenza di BKV mediante tecniche di immunoistochimica o ibridizzazione *in situ*. Talvolta è indicata l'esecuzione di una seconda biopsia renale in presenza di una persistente ed elevata replicazione virale plasmatica ma con un primo esame istologico non specifico per la diagnosi di PVAN.

Nefrite interstiziale quadro patologico. La diagnosi di BKVAN in microscopia ottica si basa sulla identificazione delle alterazioni citopatiche indotte dal *virus* a livello delle cellule dell'epitelio tubulare renale. Queste alterazioni, che sono il risultato di due eventi strettamente

correlati, quali l'accumulo di particelle virali neo formate nel nucleo cellulare e la successiva lisi cellulare *virus*-indotta, si associano spesso a necrosi dell'epitelio tubulare e conseguente danno tubulare acuto. Il danno tubulare da BKV puo' inizialmente interessare pochi nefroni e si accompagna solitamente ad un infiltrato infiammatorio, con atrofia tubulare e fibrosi.

In base alla presenza e all'estensione delle diverse alterazioni istologiche, la BKVAN viene classificata in tre quadri (A, B, C,) che rispecchiano gli stadi di progressione della malattia (4, 62).

La BKVAN di tipo A e' caratterizzata dalla presenza di alterazioni citopatiche *viru*-indotte, nel contesto di un parenchima normale; nella BKVAN di tipo B, le alterazioni citopatiche si associano a diversi gradi di infiltrato infiammatorio, atrofia tubulare e fibrosi interstiziale; nella BKVAN di tipo C, che rappresenta lo stadio terminale della patologia, si osserva una diffusa atrofia tubulare e fibrosi. Le analisi statistiche hanno mostrato come l'intervento terapeutico in presenza di lesioni renali estese (BKVAN di tipo C) si associ ad un'elevata incidenza di perdita del rene trapiantato, mentre il trattamento della BKVAN iniziato in una fase precoce di malattia (BKVAN di tipo A), sia in grado di ridurre la progressione del danno renale, determinando un significativo miglioramento della prognosi. La risoluzione di una BKVAN dopo intervento terapeutico viene diagnosticata sulla base della scomparsa delle alterazioni citopatiche e del *virus* dal tessuto renale.

Trattamento della BKVAN. L'obiettivo del trattamento dell'infezione da BKV e' quello di eliminare il virus, e nello stesso tempo di preservare la funzionalita' renale. Ad oggi, poiche' non esistono farmaci antivirali con attivita' specifica verso il BKV, il trattamento dell'infezione consiste principalmente nella riduzione dell'intensita' della terapia immunosoppressiva, associata o meno a terapia antivirale.

Il Cidofovir e il Leflunomide sono i farmaci antivirali utilizzati in alcuni centri di trapianto in combinazione con la riduzione della terapia immunosoppressiva. La loro attività inibitoria, dimostrata *in vitro*, verso il BKV, presenta un basso indice di selettività e la loro efficacia clinica risulta ancora molto dibattuta.

Il Cidofovir, è un farmaco antivirale utilizzato nel trattamento della rinite da Citomegalovirus (CMV) e viene somministrato soltanto in quei casi in cui i pazienti non rispondono alla sola riduzione della terapia immunosoppressiva. Il Cidofovir è un farmaco nefrotossico per cui il suo utilizzo deve essere valutato rispetto al possibile rischio di un'ulteriore peggioramento della funzionalità renale. Tuttavia, la sua selettiva concentrazione a livello delle cellule tubulari consente una somministrazione a dosaggio inferiore rispetto a quello utilizzato nel trattamento del CMV (0,25-1mg/ml ogni 2 settimane, per 2-4 dosi eventualmente ripetibili), riducendo il rischio di nefrotossicità (63).

Il Leflunomide è un farmaco immunosoppressore sviluppato per il trattamento dell'artrite reumatoide, ed un suo metabolita, ha dimostrato di avere proprietà antivirali. Questo farmaco come il Cidofovir, è stato utilizzato in aggiunta alla riduzione della terapia immunosoppressiva in un numero limitato di pazienti con PVAN, ottenendo in alcuni casi la stabilizzazione della funzionalità renale. Il Leflunomide è generalmente somministrato ad un dosaggio di 40 mg/ml, mantenendo nel paziente una concentrazione ematica di 50-100 ug/ml, che rappresenta il valore associato al controllo della replicazione virale *in vitro* (64).

Infine tra i presidi terapeutici impiegati nel trattamento della BKVAN ricordiamo: le preparazioni di Immunoglobuline endovena, il trattamento con i Fluorochinolonici, e la terapia con specifiche "linee cellulari" che rappresentano un'ulteriore area di sviluppo clinico per il futuro.

Allo scopo di migliorare i risultati clinici del trapianto di rene, in molti centri trapianto sono stati stabiliti, per la gestione di questa infezione, dei programmi di diagnosi precoce che permettono un intervento terapeutico anche in una fase precoce della malattia. Tra questi si è dimostrato molto importante il trattamento *preemptive* della BKVAN che si basa sull'attento monitoraggio del BKV DNA nel plasma (viremia) e nelle urine (viruria) mediante PCR quantitativa. Il monitoraggio dell'infezione da BKV è infatti l'unico strumento fondamentale per identificare i pazienti a rischio di BKVAN.

Lo *screening virologico* permette infatti di anticipare l'intervento terapeutico—nelle fasi precoci della malattia con conseguente miglioramento dell'evoluzione della malattia. Lo screening urinario andrebbe effettuato ogni 3 mesi il primo anno dopo il trapianto, ogni 6 mesi nel secondo anno, ed ogni 12 mesi fino al quinto anno post trapianto. La ricerca del BKV DNA nel plasma, mediante PCR quantitativa, rappresenta invece il test di screening di riferimento in quanto valori soglia di BKV DNA plasmatico ≥ 10.000 copie /ml correla in modo significativo con la presenza di danno renale, data l'alta sensitività del test pari al 100% , e l'elevata predittività pari all'83%. Tuttavia, poiché non tutti i pazienti con valori di BK viremia ≥ 10.000 copie /ml evolvono verso una BKVAN bisogna essere cauti nel raccomandare un livello soglia di viremia per la comparsa di nefrite interstiziale. Inoltre data la grande variabilità tra le metodiche di PCR quantitativa attualmente in uso presso i vari centri trapianto ed i laboratori ad essi associati, è necessario effettuare una validazione interna del valore che costituisce la soglia del rischio per ogni singolo centro. Il monitoraggio mediante PCR quantitativa su plasma andrebbe effettuata, in caso di viremia positiva, ogni 2-4 settimane fino alla riduzione della carica virale al di sotto dei valori soglia, per poi seguire il paziente fino alla sua completa negativizzazione. La negativizzazione della carica virale mediante la riduzione della terapia immunosoppressiva, che molto spesso è personalizzata in base alla situazione clinica

individuale del paziente, rappresenta attualmente l'unico strumento di controllo efficace della riattivazione virale in assenza di sviluppo di rigetto (65).

Rigetto in corso di BKVAN. In seguito alla riduzione della terapia immunosoppressiva, sono stati descritti, anche se raramente episodi di rigetto acuto, caratterizzati dalla presenza di un infiltrato linfocitario, di endoarterite, necrosi fibrinoide vascolare e glomerulite. Tuttavia questi episodi di rigetto acuto si sono dimostrati sensibili alla terapia steroidea senza che quest'ultima abbia determinato una recidiva di BKVAN (66).

SCOPO DELLO STUDIO

La nefropatia associata a poliomavirus BK umano (BK Virus Associated Nephropathy, BKVAN) è diventata un'importante causa di disfunzione del graft nei trapianti renali, ma le informazioni disponibili sulla sua patogenesi sono solo limitate (57, 67-72). Il BKV risiede latente nelle cellule uro epiteliali e non è risaputo che causi danno tissutale negli individui immunocompetenti (73). Il virus comunque, può riattivarsi in un quadro di immunodeficienza (es. secondario a infezione da HIV o per l'uso di farmaci immunosoppressivi), e provoca danno cellulare e disfunzione d'organo (4, 74, 75). Manifestazioni cliniche della patologia attiva da BKV includono la cistite emorragica e la nefrite, con o senza disfunzione del graft renale. La nefrite da BKV è una causa emergente di insufficienza del graft renale e il tasso di perdita del graft nel quadro di nefrite da BKV varia dal 10% all'80% (69, 76, 77). Generalmente la BKVAN incide approssimativamente da 1 a 10% dei pazienti nefro-trapiantati e porta in più del 45% dei casi a perdita irreversibile del graft (78).

I progressi nelle strategie diagnostiche hanno portato ad un incremento della sopravvivenza del graft e studi attuali che utilizzano strategie di screening precoce, hanno mostrato un ridotto tasso di perdita del graft con incidenza di BKVAN tra 15 e 30% (79, 80). Così, la raccomandazione attuale include lo screening della riattivazione del BKV con conseguente prevenzione dell'immunosoppressione in pazienti con test positivo al BKV (80). Tra tutti i metodi diagnostici di infezione da BKV disponibili, l'analisi della carica di DNA del BKV nel plasma/siero si è dimostrato essere il valore più predittivo di BKVAN, con carica di DNA del BKV superiore a 10^4 copie/ml. Diversi autori hanno mostrato (81) che lo sviluppo di BKVAN può essere prevenuto con la riduzione dell'immunosoppressione in circa il 90% dei pazienti con BK viremia identificata allo stadio precoce, sebbene altri (82) abbiano mostrato

che la riduzione dell'immunosoppressione non prevenga la progressione dell'infezione da BKV/BKVAN una volta che il BKV sia già presente.

Questi risultati sottolineano l'importanza del monitoraggio continuo e dell'identificazione precoce della riattivazione del BKV. Poichè le cellule uroteliali sono il sito primario della latenza del virus, ogni riattivazione del BKV si aspetta appaia inizialmente nelle urine. Insieme a ciò, precedenti studi hanno dimostrato una buona correlazione tra BK viremia a viruria e hanno suggerito che la replicazione del BKV nelle urine preceda la BK viremia (4, 80, 81). Altri autori (5, 82) hanno mostrato che il monitoraggio della riattivazione del BKV attraverso una PCR quantitativa delle urine può anche permettere una precoce identificazione dei pazienti ad alto rischio per lo sviluppo del BKVAN.

Pertanto lo scopo del presente studio è stato valutare prospetticamente l'incidenza di BK viremia e viruria nei pazienti riceventi graft renale per identificare coloro che sono a rischio di sviluppare BKVAN e ridurre in questi, la terapia immunosoppressiva.

MATERIALI AND METODI

Popolazione di studio

Cinquantadue pazienti trapiantati consecutivamente nell'Unità Trapianti dell'Ospedale Universitario Policlinico-Vittorio Emanuele di Catania da Novembre 2007 a Marzo 2009, sono stati arruolati nello studio prospettico longitudinale. Lo studio è stato approvato dalla Commissione Etica dell'Ospedale Universitario Policlinico-Vittorio Emanuele, Catania. Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato prima dell'arruolamento.

Monitoraggio del BKV

I campioni di sangue e delle urine sono stati collezionati a una media di 1, 3, 6, 9 e 12 mesi dopo trapianto. La BK viremia e la BK viruria sono state definite come identificazione della positività del DNA dei BKV nel siero e nelle urine, rispettivamente.

L'amplificazione dell'acido nucleico è stata effettuata mediante una metodica di PCR qualitativa utilizzando un termociclatore Perkin Elmer Gene Amp 9700 Thermo Cycler (Applied Biosystem, Monza, Italia) rispettando i parametri così come da istruzioni del kit commerciale (BKV OLIGOMIX Alert Kit Nanogen Advanced Diagnostics, Milano, Italia). Il I° ciclo di PCR ed il II° amplificavano la regione del gene codificante la Large T Antigen di BKV. Il prodotto di amplificazione veniva rilevato su gel elettroforetico al 2% di Agarosio e corrispondeva a 281 bp come lunghezza del segmento genico rilevato. Contestualmente per l'idoneità del campione veniva rilevata un'ulteriore banda di 600 bp corrispondente alla B-Globina (gene house-keeping), controllo di estrazione per ogni singolo campione analizzato. I campioni positivi per il suddetto virus sono stati successivamente confermati e quantizzati, con l'utilizzo di un kit commerciale di real-Time PCR (Q-BKV Real-Time Complete Kit, Nanogen

Advanced Diagnostics, Milano, Italia). La reazione di amplificazione veniva eseguita con un ABI PRISM 7900 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Monza, Italia) utilizzando la tecnica Taqman. Le amplificazioni avvenivano all'interno di un volume di 25 μ l contenenti 5 μ l di DNA estratto o controllo negativo o diluizioni in base 10 degli standard (plasmide virale) e 20 μ l di ampli master: amplimix + ampli probe Q-BKV Allert kit (Nanogen). Il profilo termico delle reazioni era: 50° C per 2', denaturazione iniziale di 95°C per 10' seguita da 45 cicli a 95° C per 15'' (denaturazione) e 69 C per 1' (annealing ed estensione). La quantizzazione del DNA e' stata calcolata in riferimento alla curva standard costruita sulla base del ciclo soglia CT (Cycle Threshold) di ciascuna delle diluizioni in base 10 dei plasmidi considerati nella corsa. I dati di amplificazione sono stati analizzati dal Sequence Detection System software (Applied Biosystems) e ciascun campione e' stato validato anche sulla base della presenza nel pozzetto corrispondente del gene housekeeping (beta-globina), utilizzandolo quale controllo interno di estrazione. I risultati venivano considerati accettabili con un CT della beta-globina inferiore a 39. Sulla base del calcolo eseguito dal software fornito dalla ditta del kit di quantizzazione, e' stato considerato positivo il campione che amplificava ad un CT corrispondente a 500 gEq/ml. Al di sotto di tale riferimento non era possibile quantizzare la carica virale e il valore e' stato considerato 0. I campioni eccedenti il valore soglia di 10.000 copie/mL per il siero o 10.000.000 copie/mL per le urine erano considerati positivi, suggerendo un significato clinico e interventi terapeutici; mentre il valore di identificazione è stato la carica virale più bassa misurata, 40 copie/mL per siero e urine (82).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta usando il software SPSS. I risultati sono stati presentati come media±DS o come mediana con il range come appropriato. Le variabili continue sono stati comparate con test T di Student per dati appaiati o non appaiati. Le variabili categoriche sono state comparate con test Chi-quadrato. I coefficienti di correlazione sono stati ottenuti con la regressione lineare semplice. L'analisi Kaplan-Meier è stata utilizzata per valutare il rischio di BK viruria e viremia.

RISULTATI

Popolazione dello studio

Il numero dei pazienti era 52 e la loro età media era 44 ± 14 anni. Il rapporto maschi-femmine era di 65,4% verso 34,6%. Tutti i pazienti hanno ricevuto il loro primo trapianto. Interessante notare che nessuno ha avuto rigetto acuto.

La terapia immunosoppressiva di mantenimento e' stata così composta: 39 pazienti sono trattati con tacrolimus + prednisone + mycophenolate mofetil (MMF); 2 pazienti sono stati trattati con prednisone + rapamicina + MMF; 3 pazienti sono stati trattati con prednisone + cyclosporine + MMF; 3 pazienti sono stati trattati con tacrolimus + prednisone + rapamicina; 4 pazienti sono stati trattati con tacrolimus + prednisone + acido micofenolico (MPA); 1 paziente e' stato trattato con tacrolimus + prednisone.

Prevalenza di BK viruria e BK viremia

502 campioni di siero e urine sono stati analizzati per positività al DNA del BKV. La prevalenza di BK viruria e BK viremia e' stata del 8% e del 6,4%, rispettivamente. Tutti i pazienti con BK viremia sono risultati positivi al DNA di BKV e anche nelle urine.

Associazione tra BK viruria e BK viremia

E' stato affermato, in linea con le attuali raccomandazioni, che la diagnosi di riattivazione di BKV è correlata alla carica di BKV nel siero. Sulla base di questo assunto, abbiamo valutato il valore diagnostico della BK viruria per predire la BK viremia. Così, considerando solo l'infezione sostenuta di BKV nelle urine, abbiamo ottenuto una sensibilità di 77,7%, una specificità del 93%, un valore predittivo positivo di 70%, e un valore predittivo negativo di

95,2%. L'accuratezza diagnostica totale osservata e' stata del 90,3%. E' stata osservata una elevata correlazione nel livello di carica virale tra siero e urine ($R^2=0.40$, $P<0,001$; Figura 1).

Trattamento dell'infezione da BKV e risposta terapeutica

In tutti i pazienti, i campioni di urine e siero sono stati analizzati in cinque misurazioni nel corso del primo anno dopo trapianto. In pazienti in cui la carica virale avesse ecceduto il valore soglia di 10.000 copie/mL per il siero o 10.000.000 copie/mL per le urine, sono state prese decisioni terapeutiche, riducendo regime immunosoppressivo di mantenimento. In 12 dei 52 pazienti, la carica di BK nelle urine e nel siero, hanno ecceduto 10.000.000 copie/mL e 10.000 copie/mL, rispettivamente.

In 11 di questi pazienti, è stata usata l'associazione di tacrolimus (8-10 ng/ml) + prednisone (20 mg/die) + mycophenolate mofetil (2 g/die), ridotta di una media di 2 ng/ml, 5 mg and 0,5 g, rispettivamente, per ogni visita programmata in cui il valore soglia di carica virale di BK nelle urine e nel siero fosse superata. In un paziente con BK viruria e viremia positive, è stata usata l'associazione di prednisone (20 mg/die) + mycophenolate mofetil (2 g/die) + ciclosporina (200 mg/die), ridotti a 15 mg/die, 1g/die and 150 mg/die dopo misurazione della carica virale. Tutti i pazienti che hanno superato il valore soglia di BK viruria e viremia hanno risposto alle modificazioni del trattamento.

Analisi delle cinetiche delle cariche virali

La riattivazione del BKV nelle urine è stata osservata a una media di 9 settimane (range 4-51) dopo trapianto, mentre la prima riattivazione nel siero è stata osservata a una media di 12 settimane (range 4-51). La Viruria ha preceduto la viremia di 5 settimane (range 2-9) in tutti i pazienti. In un paziente la viruria è stata osservata 2 settimane dopo trapianto, e la viremia è

stata osservata 4 settimane dopo nello stesso paziente. Il picco di carica di BKV, $1,8E+07$ copie/mL nelle urine è stato osservato a 12 settimane (range 2-51), seguito dal picco nel siero, $4,4E+04$ copie/mL a 24 settimane (range 2-51) (Figura 2). L'analisi di Kaplan-Meier ha rivelato un rischio cumulativo 18,2% e 18,7% per BK viruria e BK viremia, rispettivamente, a 1 anno (Figure 3, 4).

Associazione tra BK viruria e dati clinici dei pazienti

Dei 52 pazienti, 45 (86,5%) hanno ricevuto trapianto da donatore cadavere e 7 (13,5%) hanno ricevuto trapianto da donatore vivente. Non ci sono state differenze statistiche nell'incidenza di riattivazione del BKV nelle urine e nel siero tra donatore cadavere e donatore vivente.

DISCUSSIONE

Questo studio ha mostrato che la presenza di una persistente e significativa replicazione virale del BKV nelle urine (BK viruria) ha un'eccellente sensibilità e specificità per la presenza del BKV nel plasma ma anche permette una predizione precoce di una nefropatia associata al BKV (BKVAN) (mediamente >5 settimane prima dello sviluppo della viremia). In aggiunta a questo valore diagnostico, e all'evidenza che non è stata osservata associazione tra viruria e disfunzione renale, questi risultati hanno anche importanti implicazioni terapeutiche per adattare la terapia immunosoppressiva, riducendo così il rischio di sviluppo di BKVAN ad uno stadio precoce.

Nel corso degli ultimi dieci anni il BKV è emerso come un potenziale patogeno nei trapianti renali causando nefrite interstiziale e nefropatia associata a BKV nel 5% dei riceventi trapianto renale, che può evolvere verso insufficienza del graft in quasi metà di loro senza alcun intervento terapeutico (68, 83, 84). E' stato supposto che gli esseri umani si infettano con il BKV nella prima infanzia (85). Successivamente, il BKV rimane in uno stato latente in diversi siti tissutali, specialmente nel rene (85). La riattivazione virale è osservata di solito in pazienti con sindrome da immunodeficienza o in riceventi di organo solido o midollo osseo immunodepressi (57). La nefropatia da BKV può essere solo diagnosticata con biopsia renale. E' noto che la biopsia renale può essere effettuata ripetutamente sia per lo screening che per il monitoraggio, e comunque comporta difficoltà, rischi e richiede l'abilità di un patologo esperto. Metodi non invasivi rappresenterebbero un beneficio per medico e paziente. Come risultato, i metodi molecolari di identificazione del DNA virale nel plasma e nelle urine sarebbero di aiuto come strumento di screening dei casi suscettibili a sviluppare la nefropatia da BKV e anche come metodo di monitoraggio dell'evoluzione del danno renale (60, 86). Il presente studio,

prospettico di un singolo centro mira ad identificare l'incidenza della BK viremia e viruria con PCR nei riceventi de novo trapianto renale, in aggiunta ai fattori che influenzano la riattivazione e la replicazione virale.

Diversi studi riportano un'incidenza variabile di BK viremia e viruria variando dal 13% al 29% e dal 30% al 77%, rispettivamente (87, 88). Nel nostro studio, l'analisi dei 52 pazienti che hanno ricevuto trapianto renale de novo, ha rivelato un rischio cumulativo del 18,2% e 18,7% per BK viruria e BK viremia, rispettivamente, a 1 anno. L'incidenza sia di viruria che di viremia, è simile agli studi (82), che hanno riportato una viruria ed una viremia del 25% e 8% rispettivamente, ma più bassi di quelli trovati da Koukoulaki et al (5) il quale ha trovato una viruria e una viremia del 62% e del 72%, rispettivamente. La quantificazione dei campioni positivi ha rivelato un range ampio di carica virale che varia da poche a milioni di copie per millilitro. Un'elevata carica virale è stata associata con un aumentato rischio di sviluppo della nefropatia da BK (89, 90), ma il significato clinico di una bassa carica di virale non è stato chiarito. E'interessante notare che, nello studio di Koukoulaki et al, un basso grado di replicazione era evoluto in un'alta replicazione virale (5). Infatti, un campione positivo è indicativo dell'inizio dell'attivazione virale, che necessita la quantificazione della carica virale e misurazioni ripetute per determinare il rischio di sviluppo di malattia renale.

Inoltre, livelli elevati e persistenti di viremia sono indicativi di danno renale che avanza, e che non si è spontaneamente risolto. La rapida riduzione dell'immunosoppressione è stata dimostrata essere di beneficio nella rapida riduzione della carica virale plasmatica (80).

I risultati nel presente studio, che mostrano che la BK viremia e' stata preceduta da BK viruria e che il picco della carica virale e il numero dei pazienti positivi sono apparsi nelle urine durante il terzo e sesto mese dopo il trapianto e nel sangue durante il sesto e nono mese, confermano quelli di altri autori (4, 92). L'inizio della replicazione del BKV inizia nelle cellule

uro-epiteliali, sito di latenza, e successivamente viene escreto nelle urine prima che compaia nel siero. Nel 15% dei casi del studio di Koukoulaki (5) il BKV era identificato esclusivamente nelle urine. Se il danno progrediva e la membrana basale veniva valicata, il BKV era identificato sia nel sangue che nelle urine, come osservato nel 10% di altri studi (92, 93). Al di là di questi studi, l'utilizzo del plasma e delle urine come strumento di monitoraggio ha mostrato scarso interesse nella collettività scientifica. La prima grande analisi prospettica longitudinale che dimostri la sequenza cronologica dell'infezione del BKV fino allo sviluppo della BKVAN è quella di Babel et al (82). Analogamente ai nostri risultati questi autori sottolineano che il monitoraggio della riattivazione con PCR quantitativa nelle urine può permettere una precoce identificazione dei pazienti ad alto rischio per lo sviluppo della BKVAN. Similmente, il nostro studio e quello di Babel et al (82) sono anche in linea con i dati ottenuti da Hirsch et al (4) che hanno mostrato che la BK viruria quasi sempre precede la BK viremia.

Il nostro studio ha anche alcune limitazioni. Primo, in egual misura ad altri studi sul BKVAN, il numero dei pazienti affetti è stato limitato. Nonostante ciò, in tutti i pazienti con BKVAN, la riattivazione del BKV nelle urine e nel sangue si è manifestata molte settimane prima che i segni clinici della BKVAN si siano appalesati. Secondo, la terapia immunosoppressiva è stata molto variabile e anche la titolazione è stata basata sui risultati della BKVAN; così non siamo stati in grado di tracciare alcuna conclusione sull'impatto di differenti regimi di terapia immunosoppressiva. Infine, il nostro studio ha preso in esame solo il primo anno dopo trapianto, il che potrebbe portare ad una sottostima della prevalenza dell'infezione da BKV nella nostra popolazione di studio.

CONCLUSIONI

I programmi di sorveglianza prospettica della viruria e della viremia potrebbero aiutare ad identificare quei pazienti a rischio di sviluppare BKVAN dopo trapianto renale. La più alta incidenza di BK viruria si è osservata a 3 mesi dopo trapianto, più precoce rispetto a quanto osservato per la viremia. Questi pazienti potrebbero beneficiare di interventi precoci mirati a ridurre la terapia immunosoppressiva ed a migliorare la prognosi di questi pazienti.

BIBLIOGRAFIA

1. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantations, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999; 341;: 1725-30.
2. Sommerer C, Wiesel M, et al. The living kidney donor: giving life, avoiding harm. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 23-26.
3. Heemann U, Abramowicz D, Spasovski G, Vanholder R for the European Renal Best Practice (ERBP) Work Group on kidney transplantation. Endorsement of the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) guidelines on kidney transplantation: a European Renal Best Practice (ERBP) position statement. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26 (7): 2099-106.
4. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg GB et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation* 2005; 79: 1277.
5. Koukoulaki M, Grispou E, Pistoras D et al. Prospective monitoring of BK virus replication in renal transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2009; 11; 1-10
6. Ullman E Tissue and organ transplantation *Ann Surg* 1914; 60: 195-219.
7. Voronoy U. Sobre bloqueo del aparato reticuloendotelial del hombre en algunas formas de intoxicación por el sublimado y sobre la trasplatación del riñón cadavérico como método de tratamiento de la anuria consecutiva a aquella intoxicación. *Siglo Med* 1937; 97; 296-301.
8. Medawar PB. The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits. *J Anat* 1944; 78: 176-180.

9. Murray J. Transplantation of kidneys, experimentally and in human cases. *Am J Surg* 1954; 87:508-15.
10. Stefanini P, Casciani C, Cortesini R. The renal transplant: experimental research and first clinical experiences. *Minerva Med* 1966; 57: 2973-80.
11. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. Biological effect of ciclosporina A. A new antilymphocytic agent. *Agent Actions* 1976; 6; 468-75.
12. Berardinelli L, Vegeto A. Trapianto di rene in: *Dionigi R, Chirurgia, basi teoriche e chirurgia generale*. Milano, Masson, 2006.
13. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology, 3rd edition. *Philadelphia, WB Saunders* 1997.
14. Gordon RD, Fung JJ, Markus B. The antibody crossmatch in liver transplantation. *Surgery* 1996; 100: 705-15.
15. Kasiske L, Ramos EL, Gaston RS et al. The evaluation of renal transplant candidates: clinical practice guidelines. Patient care and education committee of the American Society of Transplant Physicians. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6: 1-34.
16. Witczak BJ, Jenssen T, Endresen K, Røislien J, Hartmann A. Risk factors for mortality in diabetic nephropathy patients accepted for transplantation. *Transplantation*. 2007; 84: 356-61.
17. Ersan S, Celik A, Atila K, et al. Tuberculosis in renal transplant recipients. *Ren Fail* 2011; 33: 753-7.
18. Veroux P, Veroux M, Sparacino V, et al. Kidney transplantation from donors with viral B and C hepatitis. *Transplant Proc* 2006 May; 38: 996-8.

19. Martina MN, Cofan F, Suarez A, et al Kidney transplantation and waiting list for renal transplantation for human immunodeficiency virus patients. *Transplant Proc* 2011; 43: 2179-81.
20. ITALIA, Centro Nazionale Trapianti. Linee guida per la valutazione di idoneità del donatore e protocolli specifici. Revisione del 1 marzo 2005.
21. Venettoni S, Curtoni ES, Scalamogna M, et al. Strategies for evaluation of suitable donor: Italian experience. 2003. *Centro Nazionale Trapianti*.
22. Di Carlo V, Socci C, Principi generali sui trapianti d'organo, in: *Dionigi R, Chirurgia, basi teoriche e chirurgia generale*. Milano, Masson, 2006.
23. ITALIA. Legge 29 dicembre 1993, n. 578. Norme per l'accertamento e la certificazione di morte. *G.U. 08 gennaio 1994, n. 5*.
24. Venuta F, Rossi M. Il trapianto di rene in Trapianti di organi e tessuti, Roma, Società Editrice Universo; 2010.
25. ITALIA. Legge 26 giugno 1967, n. 458. Trapianto di rene tra persone viventi. *G.U. 27 giugno 1967, n. 160*.
26. Kowalski RJ, Post DR, Mannon RB, et al. Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay. *Transplantation* 2006; 82: 663-8.
27. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS *Cellular and molecular immunology* 3rd edition. Philadelphia, WB Saunders 1997.
28. Urbani L, Mazzoni A, Bianco I, et al. The role of immunomodulation in AB0-incompatibile adult liver transplant recipients. *J Clin Apher* 2008; 23: 55-62.

29. Kopp JB, Klotman PE. Cellular and molecular mechanism of cyclosporin nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 1990; 1: 162-79.
30. Mohammed MA, Robertson H, Booth TA, Blupuri S, Kirby JA, Talbot D. TGF-beta expression in renal transplant biopsies: a comparative study between cyclosporine-A and tacrolimus. *Transplantation* 2000; 69: 1002-5.
31. Fulton B, Markham A, Mycophenolate mofetyl: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. *Drugs* 1996; 51: 278-98.
32. Chan GL, Erdman GR, Gruber SA, Matas AJ, Canafax DM. Azathioprine metabolism: pharmacokinetics of 6-mercaptopurine, 6-thiouric acid 6-thioguanine nucleotides in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol* 1990; 30: 358-63.
33. De Simone P, Petruccelli S, Precisi A, Carrai P, Doria R, Menichetti F, Filipponi F. Switch to everolimus for sirolimus-induced pneumonitis in a liver transplant recipient – not all proliferation signal inhibitors are the same: a case report. *Transplant Proc* 2007.
34. Fuiano G, Zoccali C, Bertoni E, et al Guidelines for ambulatory monitoring of kidney transplant patients. Adaptation of the Guidelines of the American Society of Transplantation. *G Ital Nefrol* 2004; 21 Suppl 28: S11-50.
35. Kasinske BI, Vasquez MA, Hammon WE et al. Recommendations for the outpatient surveillance of renal transplant recipients. American Society of Transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11 Suppl 15: S1-86.
36. Razonable RR. Infections in solid transplant recipients. Conference report: *Highlights from the 40 th Annual Meeting of Infectious Diseases Society of America*; October 24-27,2002; Chicago, Illinois. Medscape Transplantation, 2002.

37. Parasuraman R, Samarapungavan D, Venkat KK. Updated principles and clinical caveats in the management of infection in renal transplant recipients. *Transplant Rev* 2010; 24: 43-51.
38. Fishman JA, *Infection* in Solid-Organ Transplant Recipients. *New England Journal of Medicine*. 2007; 357: 2601-14.
39. Cervera C, Fernández-Ruiz M, Valledor A, Epidemiology and risk factors for late infection in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2011 Apr 27. doi: 10.1111/j.1399-3062.2011.00646.x.
40. Nishi SP, Valentine VG, Duncan S. Emerging bacterial, fungal, and viral respiratory infections in transplantation. *Infect Dis Clin North Am*. 2010; 24: 541-55
41. Wagener MM, Yu VL, Bacteremia in transplant recipients: a prospective study of demographics, etiologic agents, risk factors and outcomes. *Am J Infect Control* 2002.
42. Currie AC, Knight SR, Morris PJ. Tuberculosis in renal transplant recipients: the evidence for prophylaxis. *Transplantation* 2010; 90 (7): 695-704.
43. Veroux M, Corona D, Scriffignano V et al. Contamination of preservation fluid in kidney transplantation: single-center analysis. *Transplant Proc* 2010 May; 42(4): 1043-5.
44. Veroux M., Giuffrida G, Corona D, et al. Infective Complications in Renal Allograft Recipients: Epidemiology and Outcome. *Transplant Proc*. 2008 Jul-Au.
45. Gona F, Mezzatesta ML, Corona D, et al. Klebsiella pneumoniae ESBL producers responsible for severe UTIs in a renal transplant unit. *Infection* 2011; Feb; 39(1): 83-5. Epub 2011

46. Veroux M, Corona D, Giuffrida G et al. Acute renal failure due to ureteral obstruction in a kidney transplant recipient with *Candida albicans* contamination of preservation fluid. *Transpl Infect Dis* 2009; 11: 266-73.
47. Pugliese F, Ruberto F, Cappannoli A et al Incidence of fungal infection in a solid organ recipients dedicated intensive care unit. *Transplant Proc* 2007; 39 (6); 2005-7.
48. Preiksaitis JK, Brennan DC, Fishman J, Allen U. Canadian society of transplantation consensus workshop on cytomegalovirus management, in solid organ transplantation, final report. *Am J Transplant* 2005; 5: 218-27.
49. Papafragkakis H, Fabrizi F, Martin P. Viral hepatitis in renal transplantation. *Clin Nephrol* 2011;76: 29-39. Review.
50. Singh N. Fungal infections: changing epidemiology and strategies for prevention. *Program and abstract of the 40th Annual Meeting of the Infectious Disease Society of America*, October 24-27 2002, Chicago, Illinois.
51. Rostaing L, Wéclawiak H, Mengelle C, Kamar N. Viral infections after kidney transplantation. *Minerva Urol Nefrol* 2011; 63: 59-71. Review
52. Weigand K, Schnitzler P, Schmidt J, et al Cytomegalovirus infection after liver transplantation incidence, risks, and benefits of prophylaxis. *Transplant Proc* 2010; 42: 2634-41.
53. Rowshani AT, Bemelman FJ, van Leeuwen EM, van Lier RA, ten Berge IJ. Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2005;79: 381-6. Review
54. Rubin RH. Infection in the organ transplant recipient, in: Rubin RH, Young LS, eds. *Clinical approach to infection in the compromised host, 4th ed. New York: Plenum Publishing, 2000.*

55. Puius YA, Snyderman DR. Prophylaxis and treatment of cytomegalovirus disease in recipients of solid organ transplants: current approach and future challenges. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20: 419-24. Review
56. Saundh BK, Tibble S, Baker R, Sasnauskas K, Harris M, Hale A. Different patterns of BK and JC polyomavirus reactivation following renal transplantation. *J Clin Pathol* 2010 ;63: 714-8.
57. Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 611-23.
58. Meier-Kriesche HU, Li S, Gruessner RW, Fung JJ, Bustami RT, Barr ML, Leichtman AB. Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1994-2004. *Am J Transplant* 2006; 6: 1111-31.
59. Ramos E, Drachenberg CB, Papadimitriou JC et al. Clinical course of polyoma virus nephropathy in 67 renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2145-51.
60. Hirsch HH, Knwoles 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.
61. Hodur DM, Mandelbrot D. Immunosoppression and BKV nephropathy. *N Engl J Med* 2002; 347: 2079-80.
62. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hirsch et al. Histological patterns of polyomavirus nephropathy: correlation with graft outcome and viral load. *Am J Transplantation* 2004; 4: 2082-92.
63. Vats A, Shapiro R, Singh RP et al. Quantitative viral load monitoring and cidofovir therapy for the management of BK virus-associated nephropathy in children and adults. *Tranplantation* 2003; 75: 105-12.

64. Williams JW, Javaid B, Kadambi PV et al. Leflunomide for polyomavirus-type BK nephropathy. *N Engl J Med* 2005; 352: 1157-8.
65. Ginevri F, Azzi A, Botti G, Comoli P. La nefropatia associate all'infezione da polyomavirus BK dopo trapianto renale. *Giorn Ital Nefrol* 2006; 23: 575-84.
66. Drachenberg CB, Hirsch HH, Ramos E, Papadimitriou JC. Polyomavirus disease in renal transplantation. Review of pathological findings and diagnostic methods. *Human Pathol* 2005; 36: 1245-55.
67. 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.
68. Mathur VS, Olson JL, Darragh TM, Yen TS. Polyomavirus-induced interstitial nephritis in two renal transplant recipients; case reports and review of the literature . *Am J Kidney Dis* 1997; 29: 754.
69. Randhawa PS, Finkelstein S, Scantlebury V et al. Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation* 1999; 67: 103.
70. Nicleleit V, Hirsch HH, Binet IF, et al. Polyomavirus infection of renal allograft recipients from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1080.
71. Drachenberg CB, Beskow CO, Cangro CB, et al. Human polyoma virus in renal allograft biopsies: morphologic findings and correlation with urine cithology. *Hum Pathol* 1999; 30: 970.
72. Howell DN, Smith SR, Butterly DW, et al. Diagnosis and management of BK polyomavirus interstitial nephritis in renal transplant recipients. *Transplantation* 1999; 68: 1279.

73. Boldorini R, Veggiani C, Barco D, et al. Kidney and urinary tract polyomavirus infection and distribution: molecular biology investigation of 10 consecutive autopsies. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129: 69.
74. Jin L, Gibson PE, Booth JC et al. Genomic typing of BK virus in clinical specimens by direct sequencing of polymerase chain reaction products. *J Med Virol* 1993; 41: 11.
75. Nebuloni M, Tosoni A, Boldorini R et al. BK virus renal infection in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 807.
76. Vasudev B, Hariharan S, Hussain SA et al. BK virus nephritis : risk factors, timing and outcome in renal transplant recipients. *Kidney Int* 2005; 68: 1834.
77. Trofe J, Hirsh HH, Ramos E. Polyomavirus-associated nephropathy: update of clinical management in kidney transplant patients. *Transpl Infect Dis* 2006; 8:76.
78. Bonvoisin C, Weekers L, Xhignesse P et al. Polyomavirus in renal transplantation: a hot problem. *Transplantation* 2008; 85 (suppl 7) S 42.
79. Wadei HM, Rule AD, Lewin M et al. Kidney transplant function and histological clearance of virus following diagnosis of polyomavirus-associated nephropathy (PVAN) *Am J Transplant* 2006; 6: 1025.
80. Brennan DC, Agha J, Bohl DL. et al. Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *Am J Transplant* 2005; 5: 582.
81. Almeras C, Foulongne V, Garrigue V et al. Does reduction in immunosuppression in viremic patients prevent BK virus nephropathy in de novo renal transplant recipients? A prospective study. *Transplantation* 2008; 85: 1099.

82. Babel N, Fendt J, Karaivanov S et al. Sustained BK viremia as an early marker for the development of BKV-associated nephropathy: analysis of 4128 urine and serum samples. *Transplantation* 2009; 88: 89-95.
83. Binet I, Nickleit V, Hirsch HH et al. Polyomavirus disease under new immunosuppressive drugs: a cause of renal graft dysfunction and graft loss. *Transplantation* 1999; 67: 918.
84. Hirsch HH, Suthanthiran M. The natural history, risk factors and outcomes of polyomavirus BK-associated nephropathy after renal transplantation. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006; 2: 240.
85. Heritage J, Chesters PM, McCance DJ. The persistence of polyomavirus BK DNA sequences in normal human renal tissue. *J Med Virol* 1981; 8: 143.
86. Whiley DM, Mackay IM, Sloots TP. Detection and differentiation of human polyomavirus JC and BK by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4357.
87. Gardner SD, MacKenzie EF, Smith C, Porter AA. Prospective study of human polyomavirus BK and JC and cytomegalovirus in renal transplant recipients. *J Clin Pathol* 1984; 37: 578.
88. Leung AY, Chan M, Tang SC, Liang R, Kwong YL. Real-time quantitative analysis of polyoma BK viremia and viremia in renal allograft recipients. *J Virol Methods* 2002; 103: 51.
89. Nickleit V, Klimkait T, Binet IF et al. Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal allograft recipients with viral nephropathy. *N Engl J Med* 2000; 342: 1309.

90. Limaye AP, Jerome KR, Kuhr CS et al. Quantitative of BK virus load in serum for the diagnosis of BK virus-associated nephropathy in renal transplant recipients. *J Infect Dis* 2001; 183: 1669.
91. Daddhania D, Snopkoswski C, Ding R et al. Epidemiology of BK Virus in renal allograft recipients: independent risk factors for BK virus replication. *Transplantation* 2008; 86: 521.
92. Nickeleit V, Hirsch HH, Zeiler M et al. BK virus nephropathy in renal transplant tubular necrosis, MHC class II expression and rejection in a puzzling game. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 324.
93. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Wali R, Cubitt CL, Ramos E. BK polyoma virus allograft nephropathy: ultrastructural features from viral cell entry to lysis. *Am J Transplant* 2003; 3: 1383.

LEGENDA ALLE FIGURE

Figura 1. Relazione tra BK viruria e viremia nei 52 pazienti trapiantati di rene. Tutti i valori sono espressi in scala logaritmica e rappresentano le copie virali per millilitro. La retta rappresenta la regressione lineare. I dati mostrano una buona correlazione (R^2 lineare=0.40, $p<0.001$).

Figura 2. Cinetiche della carica virale di BKV. La linea intera rappresenta la carica virale media nelle urine e la linea tratteggiata rappresenta la carica virale media nel siero (copie/mL).

Figura 3. Rischio cumulativo di sviluppare BK viruria in pazienti riceventi trapianto renale. L'analisi di Kaplan-Meier ha rivelato un rischio cumulativo del 18.7% per BK viruria a 1 anno.

Figura 4. Rischio cumulativo di sviluppare BK viremia in pazienti riceventi trapianto renale. L'analisi di Kaplan-Meier ha rivelato un rischio cumulativo del 18.2% per BK viremia a 1 anno.

Figura 1

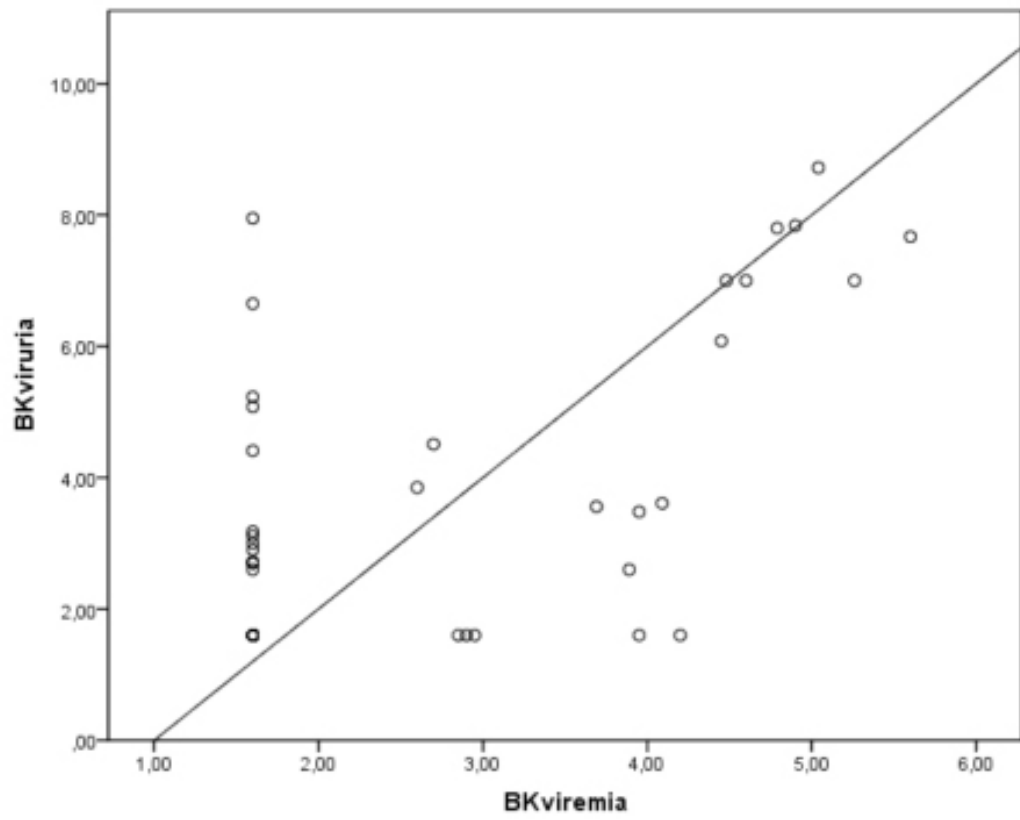
 R^2 lineare = 0.40

Figura 2

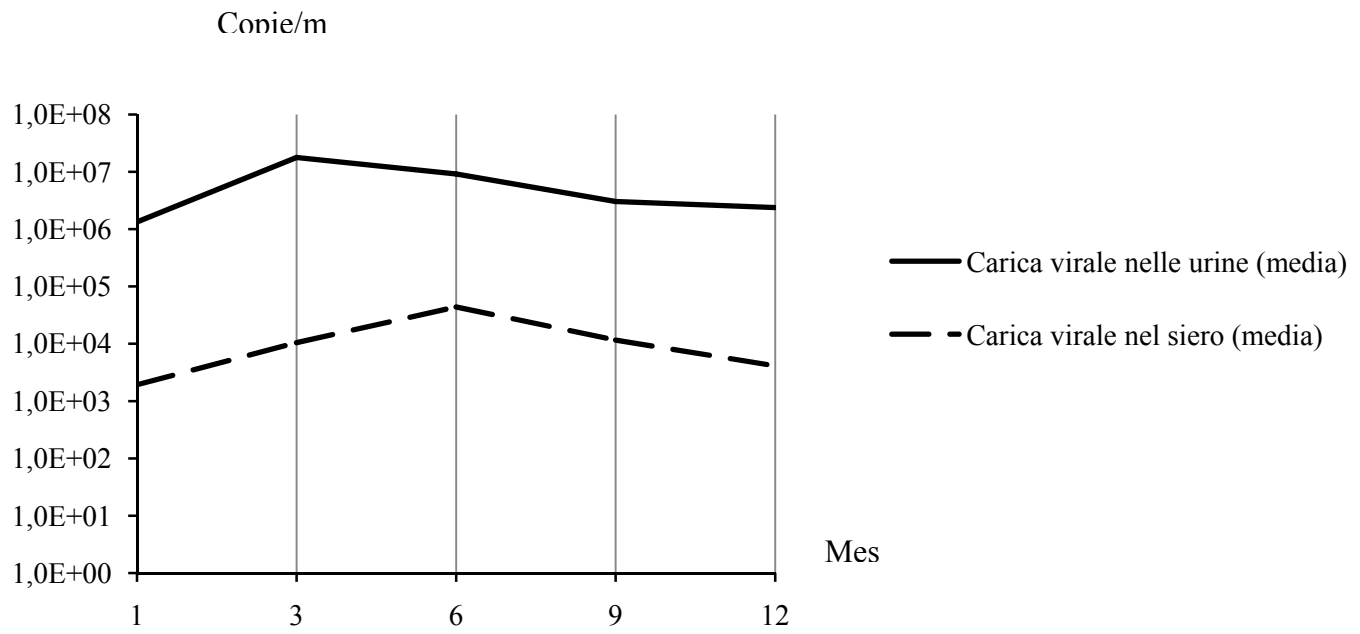


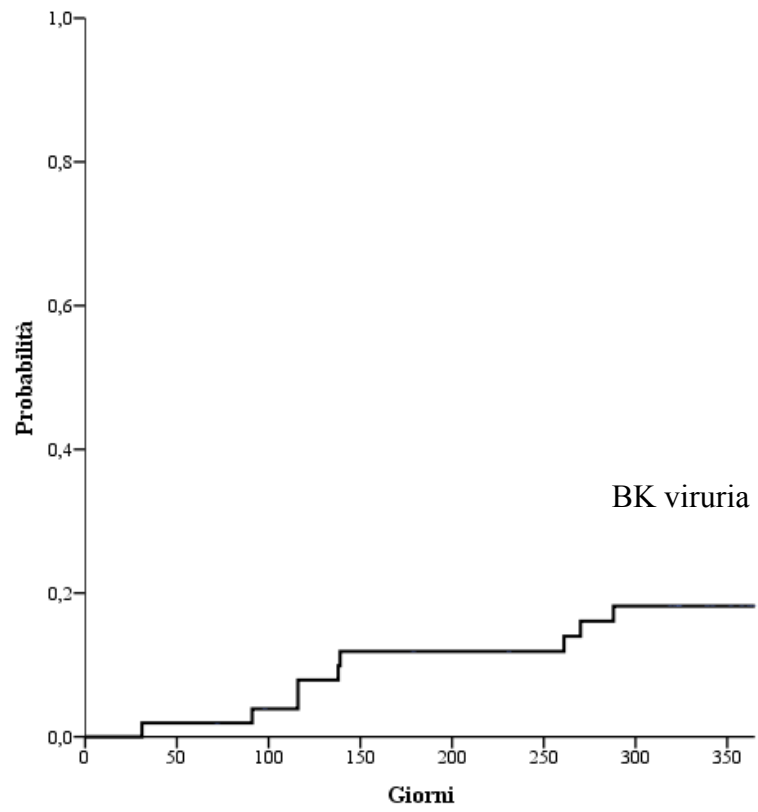
Figura 3

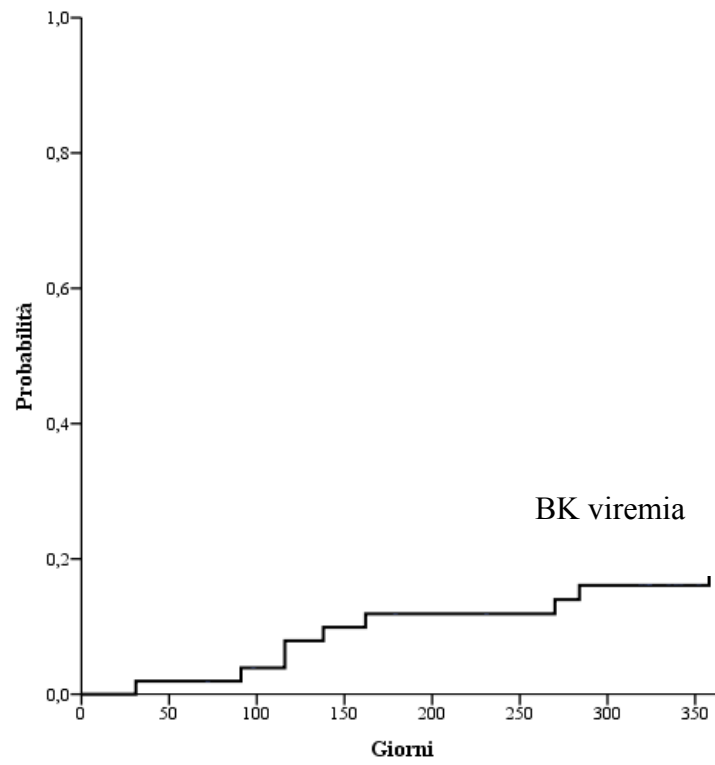
Figura 4

Tabella 1. Sopravvivenze: dati tratti dal Registro dell'United Network of Organ Sharing

Donatore	Anno	Sopravvivenza organo (%)	Sopravvivenza paziente (%)
Cadavere	1	89	94,4
Vivente	1	95	97,9
Cadavere	3	77,8	88,3
Vivente	3	87,8	94,3
Cadavere	5	66,5	81,9
Vivente	5	79,7	90,1

Tabella 2. Timing delle principali infezioni dopo trapianto

Tipo di infezione	0-30 giorni	31-180 giorni	>180 giorni
Batteriche	Polmoniti nosocomiali Infezioni da CVC Ascessi addominali	TBC Nocardiosi	Polmoniti comunitarie Listeriosi Nocardiosi Rodococcosi
Micotiche	Aspergillosi invasiva Mucormicosi Candidosi invasiva	Aspergillosi invasiva P. Carinii Altre micosi	Criptococcosi P. Carinii Altre micosi
Virali	Herpes simplex HHV6 Parvovirus B19	CMV, EBV HHV8, HBV, HCV, Parvovirus 19	Adenovirus, RSV, Virus influenzale, VZ, BK, EBV, HBV, HCV
Protozoarie		Toxoplasmosi	Leishmaniosi

Tabella 3. Incidenza delle infezioni dopo trapianto

Infezione	Fegato	Rene	Cuore	Polmone- Cuore/Pol	Pancreas- Rene+Pan
Batterica	33-68%	47%	21-30%	35-66%	35%
CMV	22-29%	8-32%	9-35%	53-75%	50%
Candida spp	1-26%	2%	1-5%	10-16%	32%
Altre micosi	2-4%	1-2%	3-6%	3-19%	3%
P. Carinii	4-11%	5-10%	1-8%	15%	-