

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Euro@lone[®]
serving science through innovation

Le proposte di Euroclone Diagnostica per le urgenze
infettive

**Viruria e viremia come marker precoci
nella diagnosi delle infezioni da virus BK**

*Dott.ssa Silvia D'Arcangelo, U.O. Microbiologia e
Virologia, Ospedale Santa Chiara, Trento*

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Polyomavirus BK

Isolato per la prima volta nel 1971, ha raggiunto significato clinico solo di recente, in concomitanza dell'emergenza della **nefropatia da BKV (BKVAN)** dovuta all'utilizzo di **immunosoppressori nuovi e altamente potenti** come tacrolimus e mofetil-micofenolato per la prevenzione del rigetto nei trapianti renali



Papovaviruses

Polyomaviruses

- SV40
- **BK virus**
- JC virus
- Hamster polyomavirus
- Murine polyomavirus
- B-lymphotropic Papovavirus of monkeys

Papillomaviruses

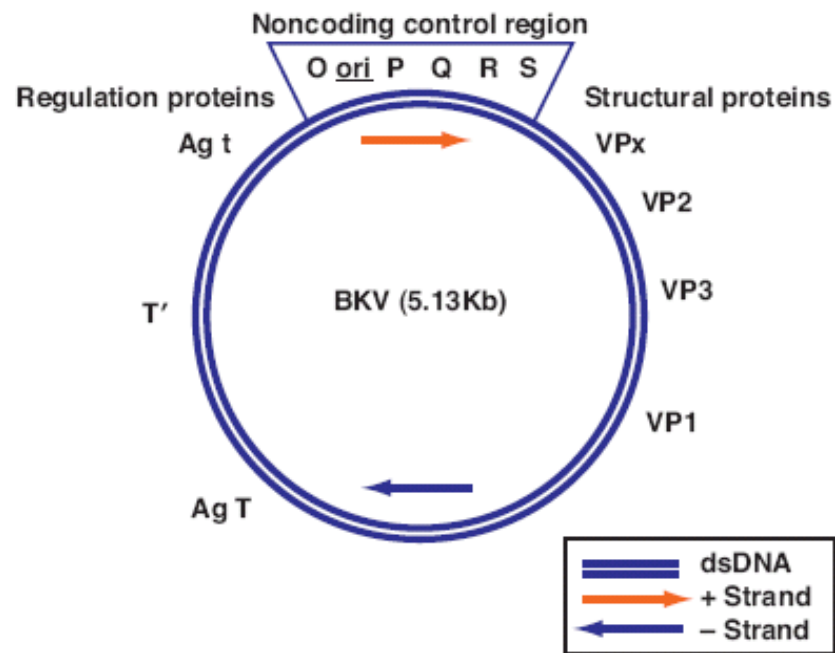
SV40: Simian virus 40 nella scimmia omologo BK umano

JC: responsabile leucoencefalopatia multifocale progressiva



BKV

- Infezione primaria nell'infanzia: sieroprevalenza negli adulti fino al 90%
- 4 gruppi serologici
- Rimane latente nell'epitelio renale e nelle cellule linfoidi



ds-DNA

3 regioni
codificanti

5130 bp



BK VIRUS codifica 6 proteine virali:

2 proteine “precoci” non strutturali o enzimatiche

- antigene “T antigen”
- antigene “t antigen”

“T antigen” è responsabile dell'immortalità cellulare e della sua latenza

1 agnoproteina (VPx) la diffusione del BKV è controllata dalla fosforilazione dell'agnoproteina (serina 11)

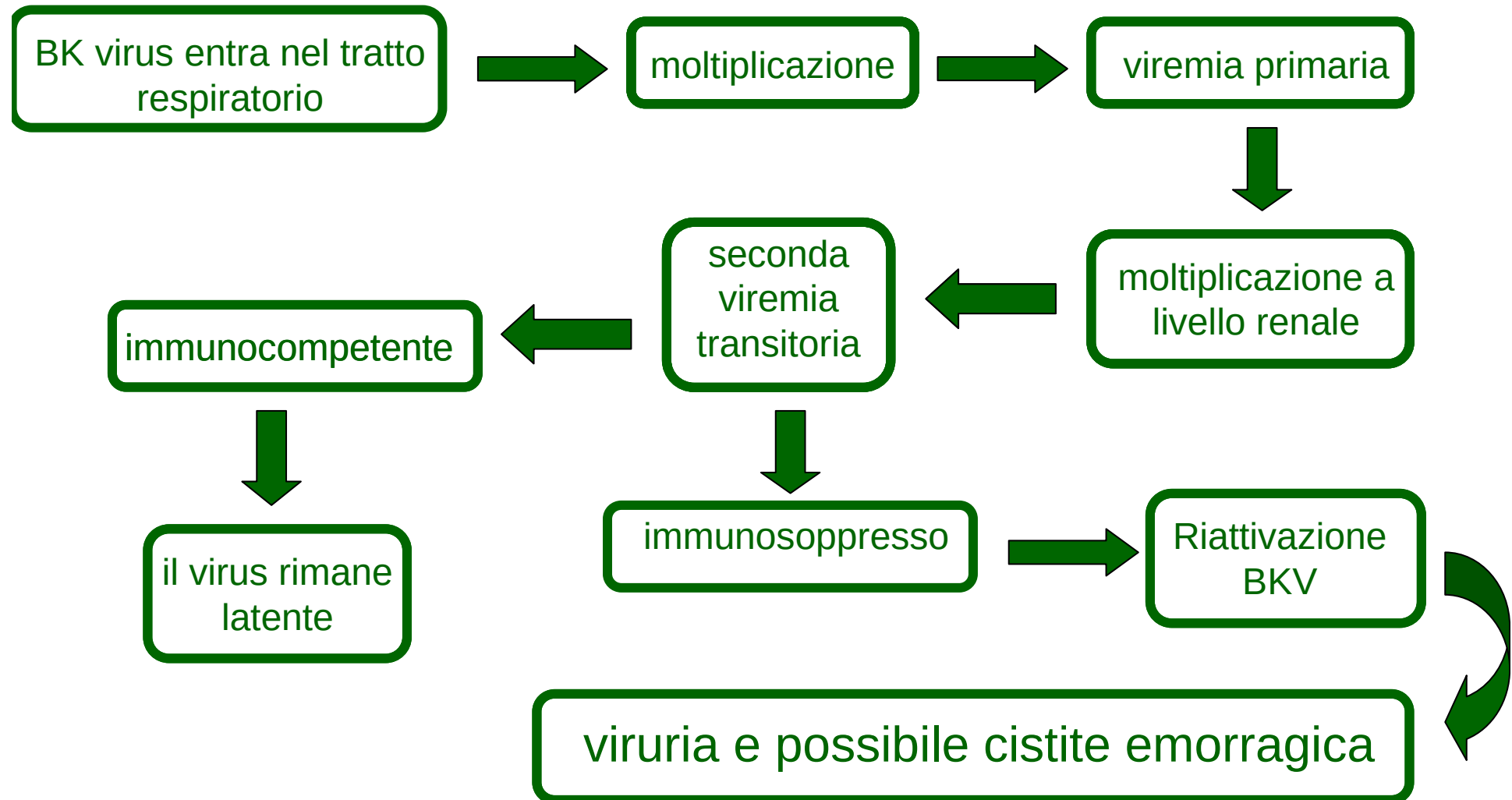
3 proteine “tardive” (sintetizzate dai “late genes”)



Riconosce il recettore della cellula ospite al quale si lega e stimola l'endocitosi del virus BK



PATOGENESI





BKVN

Differenti stadi di progressione:

- **alterazione citopatiche** (inclusioni citoplasmatiche virali, ipercromasia, necrosi tubulare) **con interessamento focale della midollare;**
- **infiltrato infiammatorio tubulo-interstiziale focale o diffuso** (tubulite);
- **apoptosi, atrofia tubulare, fibrosi e sclerosi;**
- **RIGETTO**



Quando l'infezione da BKV progredisce a nefropatia da BKV si alza il rischio di **rigetto**

BKVAN

Diagnosi precoce migliora prognosi

- Gold-standard per la diagnosi da BKVAN è la **biopsia** renale: saggio immunoistochimico che usa anticorpi specifici per gli antigeni del polyomavirus.

Altri metodi

- Valutazione **cellule di sfaldamento**: presenza di cellule nelle urine che presentano inclusioni da BKV evidenziate tramite colorazione di Papanicolaou

•PCR

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



STUDIO RETROSPETTIVO su 110 PAZIENTI TRAPIANTATI DI RENE dal
2007 al 2012 in centri afferenti al “Nord Italia Transplant” seguiti presso
l'**ambulatorio trapianto renale** dell'Ospedale Santa Chiara di Trento

Terapia immunosoppressiva dopo trapianto:

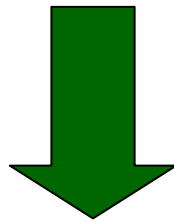


In combinazioni specifiche paziente per paziente

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



Immunosoppressione potente ➡ perdita controllo replicazione
virale



Riduzione attività linfociti T



3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



MONITORAGGIO BKV NEI PAZIENTI

Analisi qualitativa e quantitativa della carica virale effettuata tramite **Polymerase Chain Reaction**, strumento fondamentale per identificare i pazienti a rischio di BKVAN

Cadenza controlli:

- ogni 3 mesi nel 1° anno post-trapianto
- ogni 6 mesi nel 2° anno
- Annualmente fino al 5° anno

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



La ricerca di DNA virale viene normalmente effettuata su **urina**;

quando la viruria risulta positiva la frequenza dei controlli tramite PCR aumenta;

se i valori di viruria superano 10^8 copie/ml
viene valutata anche la **viremia**

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive

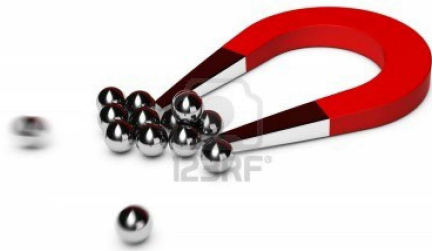
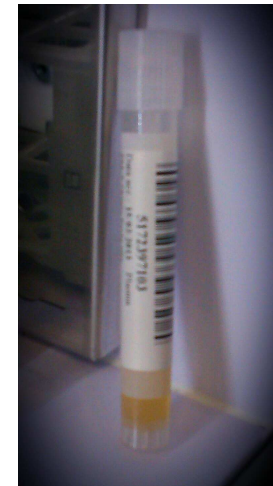


ANALISI MOLECOLARE



I campioni di sangue idonei sono conservati in provette “tappo perla” con all’interno il separatore K2EDTA che non interferisce con la ricerca di DNA, sottoposte poi a centrifugazione.

I campioni di urina sono conservati in provette sterili.



ESTRAZIONE: NucliSens® easyMAG™ (bioMérieux) estrattore automatico, estrae acido nucleico mediante particelle di silice magnetica (NucliSens® Magnetic Silica)

500 ul campione → 60 ul eluato

3° CONGRESSO NEWMICRO
...The need for speed: il
laboratorio di Microbiologia e le
Urgenze Infettive



AMPLIFICAZIONE

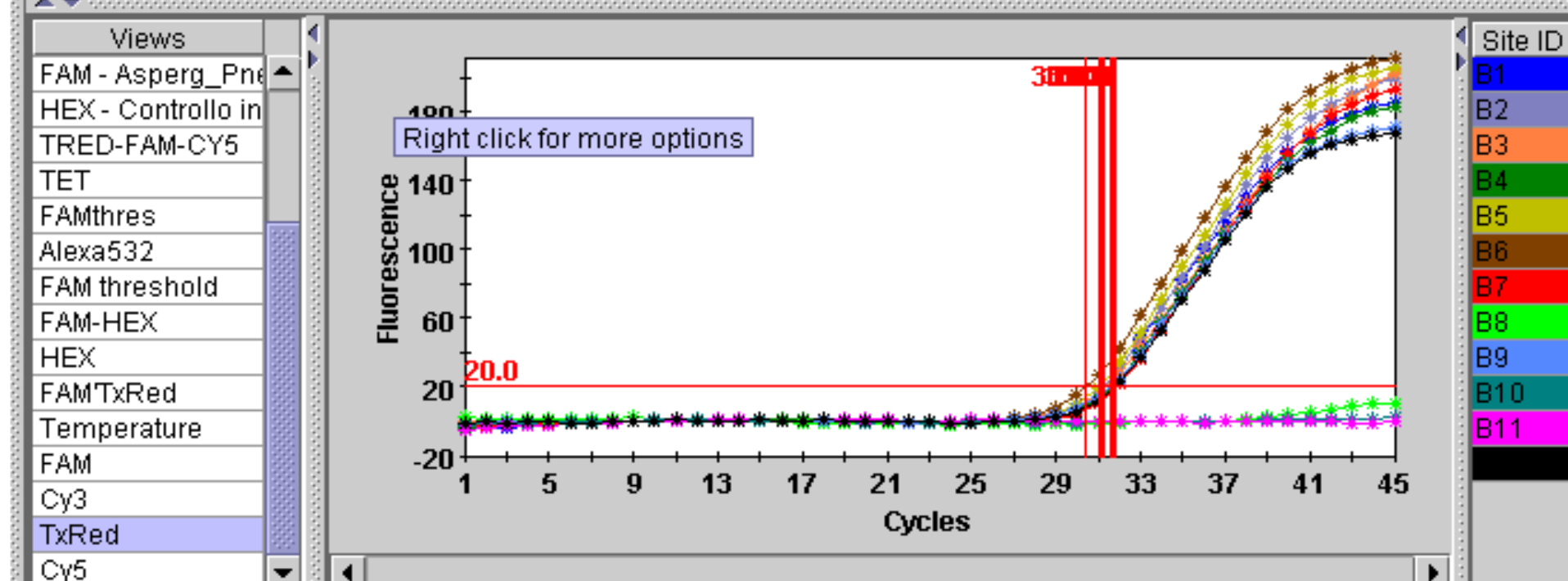
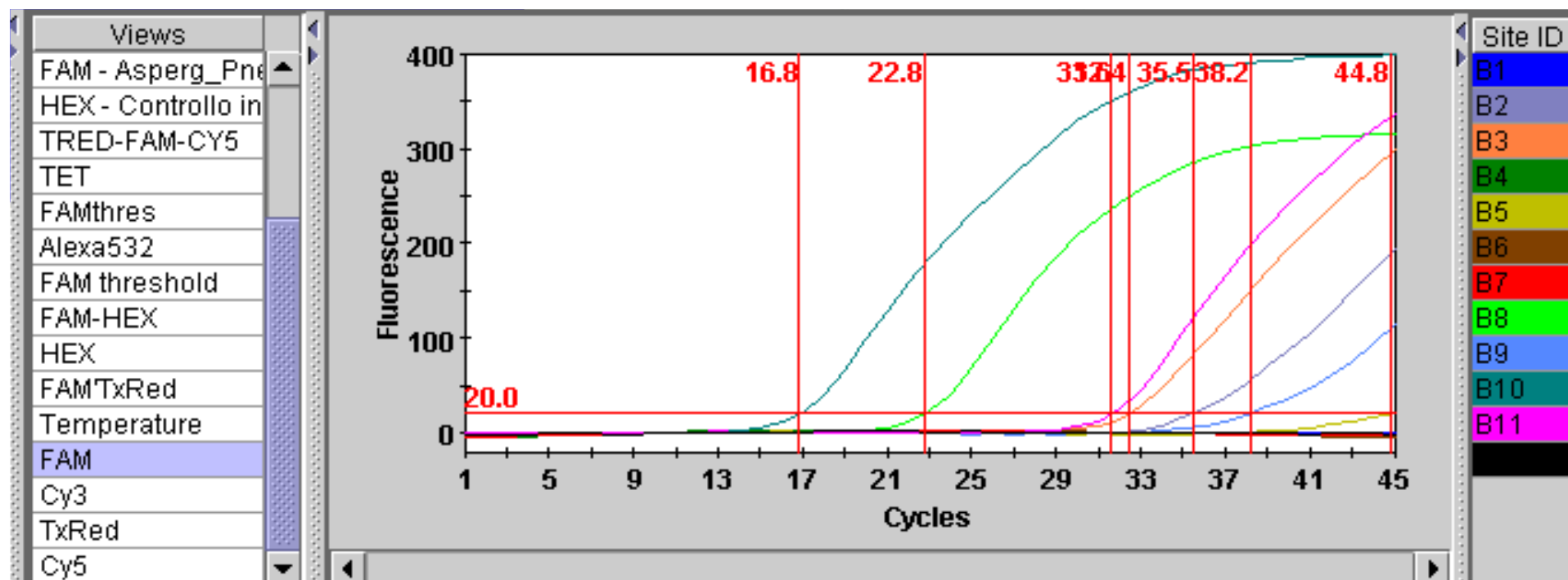
12.5 ul di estratto + 12.5 ul
di Master Mix SmartBKV
inseriti in cuvette
SmartCycler® Tube 25 ul su
cui viene effettuata una real-
time PCR su **SmartCyclerII**



Assieme ai campioni vengono testati un controllo positivo alto e uno basso a concentrazione nota e un controllo negativo: il numero di copie di BKV nei campioni viene calcolato dal software mediante la curva standard calibrata sui controlli positivi.

La regione target è la VP1 lunga circa 1 kbp.

Il range di linearità è compreso tra 300-10⁸ copie/ml su plasma e urina.





RISULTATI E CONCLUSIONI

Tra tutti i 110 pazienti, la **viruria** è stata rilevata in **30 casi**; quando il viral load supera le 10^5 copie/ml, il controllo su urina viene ripetuto a distanza di 15 giorni (in media).

La **viremia** è stata rilevata in **21 pazienti** su 30. La viremia viene valutata in genere a distanza di una settimana dal riscontro di viruria superiore alle 10^8 copie/ml.

In questi soggetti la terapia è stata corretta con la riduzione dei dosaggi degli immunosoppressori.

Nessuno tra i pazienti oggetto dello studio ha sviluppato nefropatia da BKV.

