

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ines Martinec**

**Poliomavirusna nefropatija nakon  
transplantacije bubrega**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2014.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ines Martinec**

**Poliomavirusna nefropatija nakon  
transplantacije bubrega**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2014.**

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za nefrologiju Kliničke bolnice „Merkur“ pod mentorstvom izv. prof.dr.sc. Mladena Knoteka i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2013./2014.

## **Popis kratica**

BKV (*BK virus*)

JCV (*JC virus*)

BKVAN (*BK virus associated nephropathy*)

ESRD (*end stage renal disease*)

HLA (*human leukocyte antigen*)

ICAM (*intercellular adhesion molecule*)

IS (*imunosupresija*)

MMF (*mikofenolat mofetil*)

NCCR (*noncoding control region*)

PML (*progressive multifocal leukoencephalopathy*)

PVAN (*polyomavirus associated nephropathy*)

RT – PCR (*real time polymerase chain reaction*)

SV40 (*Simian virus 40*)

## **Sadržaj**

1. Sažetak
2. Summary
3. Uvod
4. Hipoteza
5. Ciljevi rada
6. Materijali i metode
7. Rezultati
8. Rasprava
9. Zaključci
10. Zahvale
11. Literatura
12. Životopis

# 1. SAŽETAK

## Poliomavirusna nefropatija nakon transplantacije bubrega

Ines Martinec

### Uvod

Imunosupresivno (IS) liječenje predstavlja rizik za oportunističke infekcije u bolesnika s transplantiranim bubregom. Poliomavirusna nefropatija uzrokovana BK virusom (BK virusna nefropatija; BKVAN) kao infektivna komplikacija jedan je od značajnijih uzroka gubitka presađenog bubrega. Cilj istraživanja bio je utvrditi klinički tijek BKVAN i ishod presatka te osjetljivost i specifičnost citologije urina i lančane reakcije polimerazom (PCR) u dijagnostici BKVAN.

### Metode

Provedeno je retrospektivno istraživanje na 16 bolesnika s BKVAN i 32 kontrolna bolesnika s presađenim bubregom, bubregom i gušteračom te bubregom i jetrom. IS terapija se sastojala od takrolimusa, mikofenolat mofetila (MMF) i steroida u 35 pacijenata, od takrolimusa i MMF u 10, ciklosporina, MMF i steroida u 2 bolesnika, dok je jedan bolesnik primao takrolimus, azatioprin i steroide. BKVAN je liječena visokom dozom intravenskih imunoglobulina i/ili smanjenjem IS.

### Rezultati

Medijan vremena od transplantacije do PHD BKVAN bio je 366 (130-3065) dana. Citološki nalaz decoy stanica u vrijeme PHD bio je pozitivan u 73.3% bolesnika s BKVAN te u 10.71% ispitanika iz kontrolne skupine. Osjetljivost citološkog nalaza decoy stanica u urinu iznosila je 73.33% a specifičnost 89.29%. PCR za BKV DNA u plazmi bio je pozitivan u 100% bolesnika s BKVAN i 22.22% ispitanika iz kontrolne skupine. Osjetljivost PCR testa za BKVAN bila je 100%, a specifičnost PCR za BKVAN iznosila je 77.78%. Nakon postavljanja PHD BKVAN ispitanici su imali medijan praćenja od 311 (32-1898) dana. Jedan je bolesnik u tom razdoblju umro, a dvoje je izgubilo presadak. Ukupno petogodišnje preživljenje presatka nakon postavljanja dijagnoze bilo je 65.3%. Petogodišnje preživljenje bubrega u kontrolnoj skupini bilo je 90.6% (u usporedbi s BKVAN  $p=0.44$ , log-rank test). Pronađena je značajna statistička razlika između promatranih skupina u vrijednosti serumskog kreatinina 1 mjesec prije PHD ( $175.38 \pm 50.78$  s BKVAN,  $132.75 \pm 49.43$  bez BKVAN,  $p <$

0.025), u vrijeme PHD ( $202.13 \pm 68.51$  s BKVAN,  $140.09 \pm 56.14$  bez BKVAN,  $p < 0.005$ ) i 3 mjeseca nakon PHD ( $221.29 \pm 108.67$  s BKVAN,  $134 \pm 80.43$  bez BKVAN,  $p < 0.025$ ).

### **Zaključak**

BKVAN je važna infektivna komplikacija transplantacije bubrega, koja uz odgovarajući postupak u velikom postotku bolesnika ne mora dovesti do gubitka bubrežnog presatka. PCR za BKV DNA u plazmi i citologija urina predstavljaju važne testove probira bolesnika s rizikom za BKVAN.

**Ključne riječi:** BK virus nefropatija, bubrežni presadak, imunosupresija, citologija, PCR

## **2. SUMMARY**

### **Polyomavirus nephropathy following kidney transplantation**

Ines Martinec

#### **Introduction**

Immunosuppressive therapy poses risks for increased incidence of opportunistic infections in patients with a transplanted kidney. Being an infective complication, BK virus nephropathy (BKVAN) is one of the leading causes of renal transplant loss. The aim of this study was to determine the clinical course and the outcome of the graft, as well as the sensitivity and specificity of urine cytology and polymerase chain reaction (PCR) in BKVAN diagnostics.

#### **Methods**

A retrospective case-control study was conducted in a cohort of 48 patients with a kidney, kidney-pancreas, and kidney-liver transplant, 16 of whom had been pathohistologically (PHD) diagnosed with BK polyomavirus nephropathy. Immunosuppressive therapy consisted of tacrolimus, mycophenolate mofetil (MMF) and steroids in 35 patients, of tacrolimus and MMF in 10 patients, and of cyclosporine, MMF and steroids in 2 patients, while one patient was treated with tacrolimus, azathioprine and steroids. BKVAN was treated with a high dose of intravenous immunoglobulins and/or immunosuppression reduction.

#### **Results**

Median time between transplantation and PHD of BKVAN was 366 (130-3065) days. Cytology test results for decoy cells at the time of PHD were positive in 73.3% of patients with BKVAN and in 10.71% of patients from the control group of kidney transplant recipients. PCR for BKV-DNA in plasma was positive in 100% of patients with BKVAN and in 22.22% of patients from the control group. Sensitivity of positive PCR for BKV-DNA in plasma was 100% and specificity was 77.78%. Urine cytology for decoy cells had a sensitivity of 73.3% and a specificity of 89.29% for BK nephropathy. Median time of patient follow-up after the PHD of BKVAN was 311 (32-1898) days. One of the patients died during that period, and two lost the renal graft. Overall 5-year graft survival rate following diagnosis was 65.3 %, while it was 90.6% in the control group ( $p=0.44$ , log-rank test). A significant statistical difference between the studied groups was found in serum creatinine values measured 1 month before the PHD ( $202.13\pm 68.51$  with BKVAN,  $140.09\pm 56.14$  without



BKVAN,  $p < 0.025$ ), at the time of the PHD ( $202.13 \pm 68.51$  with BKVAN,  $140.09 \pm 56.14$  without BKVAN,  $p < 0.005$ ), and 3 months after the PHD ( $221.29 \pm 108.67$  with BKVAN,  $134 \pm 80.43$  without BKVAN,  $p < 0.025$ ).

### **Conclusion**

BKVAN is an important post-kidney transplant infective complication which, if properly treated, in a large percentage of patients will not necessarily result in transplant loss. Urine cytology and PCR for BKV-DNA in plasma are valuable screening tests for patients at risk of BKVAN.

**Key words:** BK virus nephropathy, kidney transplant, immunosuppression, cytology, PCR

### 3. UVOD

Transplantacija bubrega smatra se najboljim izborom liječenja završne faze kronične bubrežne bolesti (ESRD-end stage renal disease). Transplantacija bubrega kao metoda nadomjesnog bubrežnog liječenja prvi put je uspješno izvedena 1954. godine u Peter Bent Bringham Hospital u Bostonu zaslugom Josepha Murraya između dva brata blizanca od kojih je jedan bolovao od kroničnog glomerulonefritisa. Uslijedio je niz od sedam uspješnih transplantacija bubrega između jednojajčanih blizanaca, nakon čega se istražuju mogućnosti transplantacije između genetski različitih jedinki (Murray *et al.* 1958). Reakcija imunološkoga sustava domaćina protiv presatka je bila glavni problem u opstanku funkcije grafta. U svrhu rješenja istog, provedeno je prvo kliničko istraživanje djelovanja azatioprina kao potencijalnog kemijskog imunosupresiva. U kombinaciji s kortikosteroidom primijećeno je 50% veće preživljenje presatka što s napretkom kirurških tehnika vodi brzom razvoju transplantacijske medicine (Sayegh & Carpenter 2004). Prva transplantacija bubrega u Republici Hrvatskoj izvedena je 1971. godine u Rijeci. U Kliničkoj bolnici Merkur 2005. godine izvedena je prva istovremena transplantacija bubrega i jetre (Knotek & Puretić 2008). Infektivne komplikacije postaju vodeći izazovi u suvremenoj transplantaciji bubrega. Rizik od oportunističke infekcije i reaktivacija latentnih infekcija presađenog bubrega značajan su izvor morbiditeta i mortaliteta u transplantiranoj populaciji. Jedan od značajnijih uzroka gubitka funkcije grafta u novije vrijeme je poliomavirusna nefropatija (PVAN), izazvana humanim BK poliomavirusom, koja povećava rizik gubitka presatka u 1 do 15% bolesnika s transplantiranim bubregom, a isti virus je mnogo rjeđi nakon transplantacije drugih solidnih organa (Hirsch & Randawa, 2013). Etiologija PVAN se uglavnom može pripisati BK virusu, premda u oko 5% slučajeva može biti posljedica infekcije JC poliomavirusom. Poliomavirusi BK i JC sveprisutni su virusi s visokim stopama prokuženosti u općoj populaciji. Nakon primarne infekcije imunokompetentnih osoba BK i JC virusi latentno perzistiraju u različitim tkivima, naročito u urogenitalnom traktu. Reaktivacija i replikacija se može javiti u zdravih ispitanika kao asimptomatska virurija, dok u bolesnika s presađenim bubregom može biti važna virusna komplikacija prepoznata kao uzrok disfunkcije i gubitka presatka (Costa & Cavallo, 2012).

Prvotno, BK virus je izoliran iz urina primatelja alografta bubrega tretiranog IS terapijom, azatioprinom i prednisonom, te opisan kao uzrok opstruktivne uropatije transplantiranog bubrega. Otkriveni virus nije identičan s bilo kojim od prethodno opisanih članova

podskupina poliomavirusa i privremeno je imenovan BK virus prema inicijalima dotičnog bolesnika (Gardner *et al.* 1971).

Infekcija BK virusom rijetko se pojavljivala sedamdesetih i osamdesetih godina, kada je jedina dostupna održavajuća imunosupresivna terapija uključivala samo prednison i azatioprin. Nadalje, analize arhiviranih patohistoloških nalaza pokazuju trend porasta incidencije poliomavirusne nefropatije s uvođenjem potentnijih IS poput takrolimusa i mikofenolatmofetila (MMF) i njihovih kombinacija u odnosu na ranija razdoblja (Brennan *et al.* 2005). Od prvog opisanog slučaja poliomavirusne nefropatije 1995. godine, prevalencija raste i kreće se u rasponu od 1% do 10 %, a rizik gubitka grafta kreće se od 10% do 80% (Hirsch *et al.* 2005).

### **3.1 Biologija poliomavirusa**

Poliomavirusi su široko rasprostranjeni među svim kralježnjacima. Infekcija izvan dometa prirodnih stanica domaćina je uglavnom abortivna, no može promovirati onkogenu transformaciju drugih vrsta stanica. Ljudi su prirodni domaćini za humani poliomavirus 1 i 2, poznatiji kao BK virus (BKV) i JC virus (JCV), naknadno imenovani prema inicijalima bolesnika iz kojih su prvi puta izolirani. Simian virus 40 (SV 40), BKV i JCV vrste su roda poliomavirusa unutar obitelji *Polyomaviridae*, virusa bez omotača kapside ikozaedra promjera 45 mikrometara koja sadrži virusni genom, kružnu dvolančanu molekulu DNA od 5300 parova baza obavijenu staničnim histonima. Nakon ulaska virusa endocitozom, genom se ugrađuje u jezgru stanice domaćina (Hirsch & Steiger 2003). Iako je poznato 13 posebnih vrsta poliomavirusa, samo su SV40, BKV i JCV poznati izvor zaraze za čovjeka. Na genomskoj razini SV40, BKV i JCV su vrlo slični, dijele približno 75 % homologije (Trofe *et al.* 2004). Virusni genom je tipično organiziran u tri opće regije: nekodirajuće kontrolne regije (NCCR), rano kodirajuće regije za male i velike T antigene, kasno kodirajuće regije za proteine virusne kapside (VP-1, VP-2, VP-3) te agnoprotein. Nekodirajuća kontrolna regija sadrži izvor replikacije i regulatorno područje promotornih elemenata koji služe aktivaciji virusne transkripcije. T antigen veže tumor supresorske proteine Rb i p53 stimulirajući ulazak stanice domaćina u proliferacijski ciklus. Postojeće opažanje nudi teoretsku podlogu za dokazivanje poliomavirusa kao ljudskih karcinogena. Strukturni proteini virusne kapside VP-1, VP-2, VP-3, potrebni su za sklapanje cjelovite virusne čestice. Kodirajuće regije virusne kapside pokazuju znatnu genetsku heterogenost, što je iskorišteno u podijeli BK virusa u četiri posebna genotipa I, II, III, i IV, te JC virusa u razrede 1, 2A, 2B i 3 do 8. Agnoprotein se

primarno nalazi u citoplazmi i perinuklearnoj regiji stanice domaćina. Smatra se da promovira izlaz viriona iz stanice. Druge predložene uloge agnoproteina uključuju sudjelovanje u lizi stanice domaćina, smještanje VP-1 kapside u jezgru te sklapanje potpunog viriona (Randhawa *et al.* 2006).

### 3.2 Epidemiologija poliomavirusa i povezane bolesti

U šezdesetim godinama 20. stoljeća poznata su samo četiri poliomavirusa, polioma i K virusi miševa, Simian virus 40 rezus majmuna (*Macaca mulatta*) i vakuolizirajući virus zečjeg bubrega (RKV). Međutim, unutar pet godina opisana su dva ljudska člana roda *Polyomaviridae*, BK i JC poliomavirusi. Dvije neovisne skupine istraživača objavljuju svoje otkriće u Lancetu, 1971. godine kao uzastopne radove; BKV je prvi put izoliran u Londonu, a JCV u Madison, Wisconsinu (Gardner *et al.* 1971; Padgett *et al.* 1971). Više od trideset godina nakon otkrića poliomavirusa u imunokompromitiranih bolesnika nije sa sigurnošću poznat prirodan izvor i put prijenosa navedenih virusa, kao ni inicijalno mjesto replikacije, iako prisutnost BK i JC virusne DNA u tonzilarnom tkivu upućuju na primarnu replikaciju i perzistenciju u gornjem dišnom sustavu (Knowles, 2006). BK i JC poliomavirusne infekcije su visoko raširene u općoj populaciji. Primarna infekcija BK virusom najčešće se javlja u prvom desetljeću života kao što pokazuje povećanje seroprevalencije do 90% (Knowles *et al.*, 2003). Serološke studije pokazuju da se primarna BKV infekcija javlja neovisno o JCV infekciji u djetinjstvu s medijanom u četvrtoj i petoj godini života. Najniža seroprevalencija je u periodu od šest mjeseci od gubitka majčinih protutijela i raste do prosječnih 75% u odrasloj populaciji širom svijeta s rasponom od 46% do 94%, osim pojedinih zabačenih populacija Južne Afrike i Azije (Hirsch & Steiger, 2003). Naprotiv, obrazac javljanja JC virusne infekcije razlikuje se između populacija, u pojedinim dijelovima svijeta anti-JC virusna protutijela su stečena vrlo rano, dok u drugim populacijama seroprevalencija anti-JC virusa raste postepeno tijekom života, što vjerojatno ukazuje na neovisnu transmisiju različitim putevima. Dok se BKV DNA učestalo nalazi u mokraći zdravih odraslih, JC virurija javlja se u porastu s prevalencijom između 20% i 60% u odrasloj populaciji. Opisana su četiri antigena podtipa BK virusa, a trenutno je prepoznato osam genotipova JC virusa. Pojedinci s protutijelima na BKV su često seronegativni na JCV, a vrijedi i obratno (Knowles, 2006). Nakon primarne poliomavirusne infekcije u ranoj životnoj dobi, imunokompetentni domaćini su gotovo uvijek bez simptoma. Latentna virusna infekcija perzistira u različitim organima, uključujući bubrege, mokraćovod, mokraćni mjehur, mozak i slezenu (Trofe *et al.* 2004).

Poliomavirusna infekcija očituje se u vidu različitih bolesti ovisno o tipu virusa (SV40, JCV, BKV) i ishodišnom razlogu imunosupresije. JC virus se često povezuje uz progresivnu multifokalnu leukoencefalopatiju (PML) u HIV pozitivnih bolesnika (Seth *et al.* 2003), dok je BK virus učestalo u vezi s urogenitalnim traktom, uobičajeno sa slikom hemoragičnoga cistitisa u bolesnika s malignom bolešću i primateljima koštane srži, te nefropatijom u bolesnika s transplantiranim bubregom (Coleman *et al.* 1978; Binet *et al.* 2000; Hirsch 2002). BK virusni hemoragični cistitis pogađa 5% do 15% bolesnika s presađenom koštanom srži. Izvanbubrežna patologija BK virusa obuhvaća upalu pluća, encefalitis, hepatitis, retinitis i maligne bolesti (Hirsch & Randawa 2013). Rijetko, ali moguće, poliomavirusna infekcija može izazvati multiorgansko zatajenje, kao što je opisano u slučaju fatalne BK virusom izazvane vaskulopatije u bolesnika s transplantiranim bubregom (Petrogiannis-Haliotis *et al.* 2001).

### **3.3 Transmisija i patogenetski učinak poliomavirusa na čovjeka**

Tipično se poliomavirusna infekcija očituje u djetinstvu, između pete i desete godine života s postignutom seroprevalencijom odrasle dobi od 65 do 90%. Visoka incidencija poliomavirusne infekcije postavlja pitanje načina prijenosa s jednog pojedinca na drugog. Spoznajom o latenciji virusne infekcije u bubregu, urin se čini kao prirodni način širenja zaraze. Raznovrsne laboratorijske tehnike iskorištene su u svrhu procjene prevalencije virurije u dječjoj dobi. Citologija urina pokazala je virusne inkluzije u 0.1 do 2 % djece. Visoke vrijednosti virurije moguće je utvrditi metodom lančane reakcije polimerazom (PCR), no rezultati prevalencije različitih studija se razlikuju od 4 do 26,7 % (Knowles 2001). Inicijalna BKV infekcija gotovo je uvijek subklinička i prenosi se interhumano oralnim putem te se smatra da je tonzilarno tkivo sjelo primarne replikacije, a temelji se na istraživanju koje je utvrdilo BK i JC virusnu DNA u tonzilarnom tkivu (Goudsmit *et al.* 1982; Monaco *et al.* 1998). Od iznimaka, opisan je slučaj meningoencefalitisa u 13-godišnje imunokompetentne djevojčice seropozitivne na JC virus (Blake *et al.* 1992). U odraslih virusna DNA je proširena do 40% uzoraka urina, s tendencijom viših vrijednosti u starijih pojedinaca. Druge tjelesne tekućine bi mogle biti uključene u transmisiju poliomavirusa. Mogućnost feko-oralnog prijenosa dokazana je prisutnošću poliomavirusne DNA u gradskim otpadnim vodama (Bofill-Mas *et al.* 2000). Pokazano je i da krv, sjeme, genitalna tkiva i koža sadrže DNA BK virusa (Chatterjee *et al.* 2000). Potencijalni put transmisije uključuje transfuziju krvnih pripravaka, transplantacija organa, naročito bubrežnih alografta ili transmisiju spolnim putem.

Serološka poveznica primarne infekcije s gornjim respiratornim sustavom predlaže transmisiju putem aerosola. Iako kontroverzna, detekcijom IgM protutijela u krvnim uzorcima fetalnog i placentarnog tkiva pomoću PCR-a, predložena je transplacentarna transmisija (Hirsch & Steiger 2003). Detektirana je BK virusna DNA u tkivu mozga i bubrega abortiranih fetusa i tkivu posteljice, kao i u plodova uspješno iznesenih trudnoća (Pietropaolo *et al.* 1998; Penta *et al.* 2003). Latentna poliomavirusna infekcija bubrega u donora, predstavlja izvor infekcije za transplantiranog bolesnika. Istraživanje iz 1984. pokazuje da je u vrijeme transplantacije 6 od 48 (12%) bolesnika bilo seronegativno za BK virus, a zatim je 2 od 6 (33%) bolesnika razvilo serokonverziju indikativnu za primarnu infekciju BK virusom, dok je jedan bolesnik razvio viruriju (Gardner *et al.* 1984). Indirektnom imunofluorescencijom utvrđena su anti-BKV protutijela u 103 od 168 (61.3%) bolesnika s transplantiranim bubregom. U analizi 62 para donora i primatelja organa utvrđena je primarna infekcija u 18 bolesnika (29%), tipično u periodu od 3 mjeseca nakon transplantacije. U preostalih 44 bolesnika razvila se pretpostavljena reaktivacija infekcije, najčešće u roku od 3 mjeseca nakon transplantacije (Noss 1987). Serološko istraživanje na 496 donora i primatelja bubrega pokazalo je da seropozitivan donor povećava rizik primarne i ponovljene infekcije BK virusom i primarne infekcije JC virusom. Seropozitivan donor i seronegativan primatelj povezani su sa 43% incidencije primarne infekcije. Za usporedbu, u seropozitivnih primatelja seropozitivnog organa incidencija reaktivacije infekcije je 10% (Shah 2000). U novijim istraživanjima, u uzorcima seruma uzetih prije transplantacije BK virusa specifična hemaglutinacija protutijela pronađena je u 77% od 78 uzoraka (Hirsch *et al.* 2002). U 27 bolesnika s posttransplantacijskom pojavom tzv. „decoy“ stanica, 18 (78%) ih je bilo seropozitivno, a 5 (22%) seronegativno prije primanja donorskog organa. Primjećeno je da se u 3 od 5 bolesnika razvila viremija, dok se u jednoga razvila nefropatija (Randhawa *et al.* 2006). Nakon uspješne primoinfekcije, virus ulazi u latenciju koja je održana u više sijela. Virusna DNA najčešće je utvrđena u urogenitalnom traktu; mokraćnom mjehuru, bubregu, prostati, cerviksu, vulvi i sjemenoj tekućini. Po važnosti, drugo najčešće mjesto latencije su mononuklearne stanice periferne krvi. U zdravih pojedinaca detekcija gradira od 0 do 94%. JC virus pokazuje sklonost prema B limfocitima, dok je latentna BK infekcija sklona održavanju u T i B limfocitima. BK virusna mRNA detektirana je u 20 do 60% cirkulirajućih mononukleara zdravih donora RT-PCR-om, te *in situ* hibridizacijom. Limfatičko tkivo je potencijalno sijelo latentne infekcije, otkad je otkrivena BK virusna DNA u tonzilarnom tkivu i brisevima ždrijela uzetih od djece. Druga potencijalna sijela uključuju mozak, koštano tkivo i koštane tumore. Aktivacija latentnog virusa zabilježena je u različitim kliničkim stanjima.

Hormonski utjecaj na antiviralni imunitet uzrokuje asimptomatsku viruriju u trudnoći, šećernoj bolesti i starijoj životnoj dobi. Predložen mehanizam reaktivacije poliomavirusa je i koinfekcija s drugim virusima. Dokazani okidač za reaktivaciju JC virusa je infekcija herpesvirusom 6 (HHV6). Dobro poznati rizični čimbenik za reaktivaciju je stanje imunosupresije. BK virurija zabilježena je u 20 do 44% HIV pozitivnih pojedinaca, 22 do 100% primatelja koštane srži, 10 do 60% bolesnika s transplantiranim bubregom te u 50% bolesnika s transplantiranim srcem. Virusom inducirane promjene ekspresije genoma stanice domaćina patogenetski su izvor oštećenja zaraženog tkiva, konkretnije u ovom slučaju BK virusne nefropatije (BKVAN). Infekcija BK virusom uključuje ugradnju virusnog genetskog materijala u genom zaražene stanice, čime preuzima kontrolu nad velikom skupinom proteina koji reguliraju stanični ciklus. Obratno, replikacija poliomavirusa ovisi o faktorima replikacije zaražene stanice koji nisu izraženi, ako je stanica u fazi mirovanja. Na taj način regulirano je i nekoliko proupalnih citokina u ranoj (IL- 1, TNF) i kasnoj (IL-6, IL-11) fazi imunološkoga odgovora. Poznato je da interleukin 1 (IL-1) induciraju gotovo svi mikroorganizmi, čime se uzrokuje febrilna reakcija i stimuliraju drugi proupalni citokini koji pojačavaju akutnu fazu upalnog odgovora. Povećana je ekspresija citokinskih receptora IL-4R i IL- 13R, koji sudjeluju u stimulaciji B-limfocita i plazmastanica, te produkciji antivirusnih protutijela. BK virusna infekcija uzrokuje povećanu sintezu mRNA odgovornu za unutarstaničnu adhezijsku molekulu ICAM-1 (CD 54), eksprimiranu u stanicama tubularnog epitela za koju se pretpostavlja da je odgovorna za intersticijsku upalu bubrega. U staničnim kulturama BK virusna infekcija pokazala je stimulirajući učinak na transkripciju tri skupine molekula tkivne podudarnosti razreda I (HLA-B, HLA-C, HLA-F) , što bi moglo objasniti preklapanje BK virusne nefropatije s akutnim odbacivanjem grafta. Virusom inducirana povećana sinteza kolagena VII koji se inače u normalnom glomerulu ne eksprimira, a služi učvršćivanju dermo-epidermalnog spoja, mogla bi doprinijeti progresivnom stvaranju striktura i ožiljkavanju koje prati BKVAN. Uloga interleukina, citokina i staničnih adhezijskih molekula u patogenezi BK virusne nefropatije otvara mogućnost djelovanja na farmakološkoj razini kako bi se smanjila ozljeda grafta posredovanjem poliomavirusa. Takva intervencija posebno bi bila indicirana bolesnicima s progresivnim intersticijalnim nefritisom koji ne odgovra na redukciju imunosupresije i terapiju cidofovirom (Randhawa *et al.* 2006).

### **3.4 Potencijalni rizični čimbenici za razvoj poliomavirusne nefropatije nakon transplantacije bubrega**

Još uvijek postoji nepotpuno razumijevanje čimbenika rizika za razvoj poliomavirusne nefropatije. Nedostaje dovoljan broj prikladno osmišljenih prospektivnih multicentričnih istraživanja, a rezultati postojećih često su u kontradikciji. Vrlo vjerojatno, PVAN je posljedica multiplih komplementarnih obilježja, uključujući odrednice samog bolesnika (dob < 50 godina, muški spol, negativan BK serostatus prije transplantacije, oštećen T odgovor specifične imunosti, bijela rasa, citomegalovirusna (CMV) koinfekcija, šećerna bolest), odrednice alografta (HLA nepodudarnost, prijašnje epizode akutnog odbacivanja, toksičnost kalcineurinskih inhibitora) i samog virusa (novi BKvirusni serotipovi, adaptivne promjene s povećanom virulencijom). Pretpostavlja se da su ovi faktori modulirani IS terapijom, koinfekcijom JC virusom, CMV-om ili SV40, upalnim odgovorom, te antivirusnom terapijom poput cidofovira. Ozljeda grafta pri akutnoj reakciji odbacivanja smatra se značajnim rizikom za aktivaciju replikacije BK virusa i oštećenje grafta u vidu BK virusne nefropatije (Hirsch & Steiger 2003). Pokazan je trend većeg broja HLA nepodudarnih donora i primatelja grafta u transplaniranih pacijenata s BK viremijom i razvijenom nefropatijom, nego u onih bez BK replikacije i znakova nefropatije. Ista kohortna studija pokazala je pozitivnu povezanost HLA nepodudarnosti i broja primjene kortikosteroidnih bolusa u akutnoj reakciji odbacivanja s pojavom BK virusne replikacije i razvojem nefropatije, a istraživani su i učinak hladne ishemije te CMV koinfekcije, no nije dokazana značajna povezanost. U pretransplantacijskim uzorcima serumima 59 od 78 pacijenata (77%) pronađena su BK virusna specifična protutijela, a od 23 bolesnika s pojavom „decoy“ stanica, njih 18 je bilo seropozitivno prije transplantacije, dok je u 3 od 5 seronegativnih dokazana BK viremija, a samo u jednog bolesnika razvijena je nefropatija. Od 5 pacijenata s BKVAN-om, 4 ih je bilo seropozitivno prije transplantacije (Hirsch *et al.* 2002). Visok anti-BKvirusni specifični titar donora u odnosu na nizak ili nemjerljiv titar primatelja pokazuje povezanost s povećanim vremenom do BK nefropatije (Sood *et al.* 2013). Većina dijagnoza postavljena je u bolesnika s trostrukom IS terapijom. U otprilike 90% slučajeva, trostruka terapija sadržavala je takrolimus i MMF. Obratno, u manje od 10% slučajeva PVAN, terapija nije sadržavala takrolimus i MMF. Poliomavirusna nefropatija dijagnosticirana je i u transplaniranih bolesnika čija terapija nije sadržavala takrolimus i MMF. Uloga IS naglašena je činjenicom da redukcija, promjena i rekombinacija komponenata terapije održavanja predstavlja primarni korak intervencije. Steroidi kao sastavni dio IS terapije održavanja imaju sinergistički učinak proporcionalno s



intenzitetom terapije na pojavu povećane replikacije poliomavirusa (Hirsch *et al.* 2006). Uspoređujući relativno mali uzorak od 7 transplantiranih s BK nefropatijom i 42 kontrole u istraživanju slučajeva i kontrola dobiven je podatak o 13 puta većem riziku za bolesnike izložene trostrukoj IS terapiji koja sadržava takrolimus, MMF i prednison, te značajnu povezanost koncentracije takrolimusa  $>8\text{ng/ml}$  i akutne reakcije odbacivanja u prvom mjesecu s razvojem BKVAN. Preživljenje grafta u odnosu na kontrolnu skupinu bilo je značajno lošije (Mengel *et al.* 2002). Prema istraživanju iz 2002. godine na većem uzorku od 67 bolesnika s histološkom dijagnozom BK nefropatije i 167 uparenih kontrola, nije dobivena značajna uloga pojedinačnih IS kao rizika za BK nefropatiju, ali je pokazana dominacija muškog spola ( $p=0.002$ ) i starije životne dobi ( $p=0.0004$ ) bolesnika s BK nefropatijom u odnosu na kontrolnu skupinu (Ramos *et al.* 2002). Zanimljivo je rijetko izvješće o razvoju PVAN kod nebubrežnih primatelja alografta poput srca, jetre ili gušterače koji su uglavnom izloženi višim dozama IS lijekova. Iz tog razloga postoji opravdano mišljenje o utjecaju drugih čimbenika, osim IS, na pojavu PVAN. Iako se čini da je IS preduvjet za razvoj PVAN, interakcija više čimbenika poput vrste i kombinacije IS lijekova, obilježja bolesnika i stanja grafta doprinosi razvoju PVAN. Kako je PVAN infektivna komplikacija, mnoga istraživanja su usmjerena na pronalazak uzroka u pojedinom imunosupresivnom lijeku, no još nije dokazana povezanost ni jednog imunosupresiva s BK replikacijom (Trofe *et al.* 2004).

Kontrola BK virusne replikacije pokazuje povezanost s razvojem specifičnog anti-BK virusnog staničnog imunološkog odgovora, no nije u potpunosti razjašnjena. bolesnici sa samolimitirajućom BK virusnom reaktivacijom razvijaju specifični T-stanični odgovor bez terapijske intervencije unutar jednog mjeseca, dok bolesnici s razvijenom BK nefropatijom isti odgovor postignu nakon terapije unutar osam mjeseci. Bolesnici s razvijenom nefropatijom u vrijeme oporavka pokazuju najveću učestalost specifičnog T-staničnog odgovora i povećanu produkciju BK specifičnih IgG protutijela, te trajno povećanu razinu BK specifičnih IgM protutijela (Schachtner *et al.* 2011). Istraživanje na stotinu transplantiranih pedijatrijskih bolesnika pokazalo je seronegativan status primatelja kao rizični čimbenik za BK virusnu replikaciju i PVAN (Ginevri *et al.* 2003). Iako većina transplantiranih posjeduje pozitivan IgG serostatus, dolazi do visoke razine virurije i viremije, te nefropatije, što upućuje da pozitivan IgG titar ne sprječava progresiju nefropatije i da specifični T stanični odgovor ostvaruje ključnu ulogu u kontroli bolesti (Hirsch *et al.* 2002). Prethodna izloženost nije se pokazala zaštitnim čimbenikom od BK virusne replikacije nakon transplantacije bubrega. Tijek produkcije BK virusnih specifičnih protutijela prati razinu i trajanje BK virusne replikacije u kohorti transplantiranih primatelja s izraženom viremijom i virurijom. Uslijed

smanjenja IS, primjećen je pojačani specifični T-stanični odgovor sa smanjenjem serumske razine kreatinina i stabilizacijom funkcije alografta (Ginevri *et al.* 2007).

### **3.5 Klinički izazovi i ishod grafta nakon transplantacije bubrega uslijed razvoja poliomavirusne nefropatije**

U uvjetima imunosuprimiranosti kao što je stanje nakon transplantacije, može se pokrenuti reaktivacija i replikacija uspavane BK virusne infekcije koja vodi u intersticijski nefritis s potencijalnim gubitkom bubrežnog alografta. Procjena pojave BK virusne nefropatije u svih bolesnika s transplantiranim bubregom kreće se od 2 do 10%, a preživljavanje grafta nakon dijagnoze je u rasponu od 10 do 60%, što je lošiji ishod od kalcineurinske nefrotoksičnosti i reakcije akutnog odbacivanja (Weiss *et al.* 2008).

Početak aktivnosti bolesti nema posebnih kliničkih znakova i simptoma. Kasnije dolazi do povećanih serumskih razina kreatinina, što ukazuje na pogoršanje funkcije alografta. Patohistološke značajke poliomavirusne reaktivacije razlikuju se od znakova reakcije akutnog odbacivanja u bioptičkom materijalu alografta. Prema nekim istraživanjima stanice urinarnoga trakta koje sadrže virusne inkluzije kao znak virusne replikacije poznate kao „decoy“ stanice nisu dovoljno specifičan marker BK virusne nefropatije. Aktivnost BK replikacije grafta podudara se s detekcijom virusne DNA u plazmi PCR-om (Hirsch *et al.* 2002). Dijagnoza PVAN postavlja se najčešće unutar prve godine nakon transplantacije sa srednjim vremenom od 44 tjedna (Hirsch & Steiger 2003), a 95% dijagnoza postavi se do isteka druge posttransplantacijske godine (KDIGO Transplant Work Group 2009). U prvoj posttransplantacijskoj godini PCR pokazuje BK viruriju u 30 do 60%, a BK viremiju u 10 do 20% bolesnika. Redovito praćenje PCR metodom pokazalo je sporije napredovanje nefropatije nakon redukcije IS (Brennan *et al.* 2005). Preporuke smjernica za praćenje BK virusne replikacije uključuju prepoznavanje BK virusa u urinu i plazmi, te biopsije bubrega svaka 3 mjeseca u prve 2 godine nakon transplantacije i jednom godišnje narednih 5 godina, te nakon liječenja akutnog odbacivanja i pri neobjašnjivom porastu serumskog kreatinina. Savjetuje se prilagodba algoritma praćenja prema obilježjima pojedinog kliničkoga centra u smislu veće ili manje pojavnosti BK nefropatije u određenim populacijama (Hirsch& Randawa 2013). Zlatni standard konačne dijagnoze poliomavirusne nefropatije je biopsija bubrega i patohistološka potvrda dijagnoze. Lažno negativni rezultati u do 30% slučajeva mogu se javiti u ranoj fazi razvoja PVAN. Veća osjetljivost može se postići adekvatno uzetim uzorkom tkiva koje sadrži bubrežnu srž i korištenjem veće bioptičke igle (Drachenberg *et al.*

2004). Patohistološki uzorak progresije poliomavirusne nefropatije prolazi kroz tri glavna stadija infiltracije upalnim stanicama, tubularnom atrofijom i završnom fibrozom nakon dugorajnoga virusnoga oštećenja (Hirsch *et al.* 2005). Patološke promjene pokazuju multifokalnu raspodijelu. Histološka dijagnoza se temelji na detekciji tipičnih intranuklearnih bazofilnih inkluzija epitelnih stanica bubrežnih tubula i Bowmanovog urotela. Imunohistokemijskim bojanjem dokazuje se virusni SV40 veliki T antigen za koji križno reagiraju BK virus, JC virus i SV40. Završna faza PVAN patohistološki i klinički odgovara završnom stadiju kronične bubrežne bolesti s fibroznim ožiljkavanjem i progresivnom obliteracijom bubrežnih tubula, te niskim vrijednostima viremije i virurije. Početna asimptomatska faza bolesti može se detektirati značajnom viremijom PCR-om (>100 000 kopija/ml) ili citološkim dokazom prisutnosti „decoy“ stanica u urinu kroz dva mjeseca. Pojava virurije i viremije prethodi porastu serumskog kreatinina više tjedana ili mjeseci. Pri pojavi izolirane virurije nije potrebna intervencija u smislu smanjenja imunosupresije (Ramos *et al.* 2009). Zabilježeni su i slučajevi pozitivne histološke dijagnoze s negativnom BK viremijom, pri čemu je potrebno isključiti metodološke propuste (Drachenberg *et al.* 2004) i mogućnost reaktivacije infekcije JC virusom koji je tipično nemjerljiv u krvi, ali s izrazito visokom virurijom (Kazory *et al.* 2003). Osim dokazivanja virusne DNA PCR-om, detekcija BK virusa moguća je citološkim pregledom urina s pojavom „decoy“ stanica. Pozitivna prediktivna vrijednost BK viremije kreće se od 30 do 50%. Visoke vrijednosti BK virurije prethode viremiji 4 do 12 tjedana, čime se s visokom negativnom prediktivnom vrijednosti može isključiti BKVAN. Pregled urina konvencionalnom citologijom za potragom „decoy“ stanica jeftina je i neinvazivna metoda. Niska pozitivna prediktivna vrijednost testa i nepouzdana kretanje klirensa, viruriju čine ograničujućom metodom u praćenju dinamike bolesti i terapijske intervencije u vidu smanjenja imunosupresije (Hirsch *et al.* 2014).

Trenutne mogućnosti liječenja BK virusne nefropatije uključuju više načina smanjenja IS, nespecifične antiviralne agense poput cidofovira, kinolona, imunomodulatora leflunomida, te intravenske imunoglobuline. Temelj liječenja je smanjenje IS, pošto je utvrđena značajna povezanost trostruke IS terapije kombinacijom kalcineurinskih inhibitora (takrolimus, ciklosporin), antiproliferativnih agenasa (MMF, azatioprin) i kortikosteroida (Costa & Cavallo 2012). Rana dijagnoza s pravovremenom terapijskom intervencijom razultira boljim ishodom grafta. Postavlja se pitanje rizika akutnog odbacivanja koji je procijenjen na otprilike 15% nakon izmjena u liječenju, no kako se virurija javlja prosječno nakon 5 do 6 mjeseci, kada prolazi najveći rizik odbacivanja grafta taj rizik je ublažen. Rijetko, ali moguća je istovremena pojava aktivne BK nefropatije i akutnog odbacivanja. Nedostaje konsenzus o

optimalnom pristupu u izmjeni IS terapije. Dvije su vodeće strategije od kojih jedna zastupa prvotnu redukciju kalcineurinskog inhibitora za 25 do 50% u jedan do dva koraka, a potom redukciju antimetabolitnog agensa, dok druga predlaže suprotno. Zabilježena je i alternativna verzija istovremene redukcije oba lijekova, te zamjene lijekova unutar terapijske skupine. Početni *in vitro* dokazi upućuju da ciklosporin posredovanjem u specifičnom T staničnom odgovoru imunološkog sustava na BK virus, ostvaruje protuviralnu aktivnost potiskivanjem BK replikacije. Pojedina istraživanja dokazuju koristan učinak ciklosporina na smanjenje viremije nakon uvođenja u terapiju na mjesto takrolimusa, no to svojstvo je potrebno dalje istražiti. Povećana razina IS u liječenju kombinacijom takrolimusa i MMF koja uključuje rizik za BKVAN objašnjava se farmakokinetičkim interakcijama takrolimusa i ciklosporina s MMF. Naime, dokazana je značajno veća koncentracija mikofenolične kiseline, aktivnog metabolita MMF-a u dvojnog liječenju s takrolimusom, nego što je izmjerena s ciklosporinom (Acott & Babel 2012). Prema retrospektivnom istraživanju na 35 slučajeva BKVAN od 910 transplantiranih pacijenata pokazan je statistički značajan ( $p=0.003$ ) učinak potpunog povlačenja jednog od tri IS u odnosu na smanjenje doza svih triju IS lijekova (Weiss *et al.* 2008). Sve reducijske strategije čine se sigurnima u jednogodišnjem praćenju s rasponom reakcije akutnog odbacivanja od 4 do 14%, koja odgovara na steroidnu terapiju. Učinak dugoročnoga smanjenja IS terapije na ishod grafta tek predstoji ispitati. Do danas niti jedno randomizirano istraživanje nije potvrdilo bolji učinak kombinacije prethodno navedenih pristupa s antiviralnom terapijom nad izoliranom IS redukcijom. U teoriji, mogla bi se spriječiti ili umanjiti transmisija virusa seropozitivnog grafta na seronegativnog primatelja upotrebom specifičnog intravenskog imunoglobulina, no takvo rješenje još nije praktično razvijeno. Retrospektivna istraživanja pokazuju različiti učinak fluorokinolona, a randomizirana prospektivna istraživanja su u tijeku (Hirsch *et al.* 2014).

#### **4. HIPOTEZA**

Hipoteza ovog istraživanja bila je da bolesnici s transplantiranim bubregom i patohistološki dokazanom BK poliomavirusnom nefropatijom imaju lošiji ishod i preživljenje bubrežnog presatka u odnosu na kontrolnu skupinu.

#### **5. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Opći cilj ovog istraživanja bio je utvrditi funkciju i preživljenje bubrežnog presatka nakon pojave BK virusne nefropatije, u odnosu na kontrolne bolesnike bez BKVAN.

Specifični ciljevi

1. Utvrditi važnost praćenja serumske koncentracije kreatinina kao prediktivnog čimbenika za BKVAN.
2. Utvrditi razinu imunospresivnog liječenja u vrijeme pojave BKVAN u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika bez BKVAN.
3. Određivanje osjetljivosti i specifičnosti tepozitivne i negativne prediktivne vrijednosti citologije urina s nalazom decoy stanica u vrijeme patohistološke dijagnoze BKVAN
4. Određivanje osjetljivosti i specifičnosti tepozitivne i negativne prediktivne vrijednosti PCR u vrijeme patohistološke dijagnoze BKVAN.

## **6. ISPITANICI I METODE**

### **6.1 Karakteristike ispitanika**

Provedeno je retrospektivno istraživanje slučajeva i kontrola (engl. case-control) u kojem je uspoređen klinički značaj i karakteristike bolesnika s BK poliomavirusnom nefropatijom (BKVAN) u usporedbi s kontrolnom skupinom bolesnika bez BKVAN. Ukupno je uključeno 48 bolesnika (16 žena i 31 muškarac) s transplantiranim bubregom, bubregom i gušteračom te bubregom i jetrom sa 6 živućih i 42 umrla donora u Kliničkoj bolnici „Merkur“ zaključno s ožujkom 2013. godine. Od njih, u 16 bolesnika je patohistološki (PHD) dijagnosticirana BKVAN. Budući da je izolacija humanih poliomavirusa previše zahtjevna da bi se provodila izvan istraživačkih laboratorija, definitivna dijagnoza BKVAN se postavlja biopsijom bubrega i patohistološkom analizom bioptata bubrežnog tkiva. Patohistološka dijagnoza temeljena je na histološkim značajkama bubrežnoga presatka klasičnim hemalaun-eozin bojanjem pod svjetlosnim mikroskopom te imunohistokemijskom metodom dokazivanja prisutnosti BK virusnih inkluzija u bubrežnom parenhimu presatka. Kontrolna skupina odabrana je prema vremenskoj podudarnosti transplantacije. Svaki bolesnik s PHD BKVAN imao je 2 kontrolna ispitanika s transplantiranim bubregom u istom vremenskom periodu. Radi prevelikoga vremenskoga razmaka, 3 bolesnika imaju samo jednog kontrolnog ispitanika. Svim ispitanicima mjerene su serumske koncentracije kreatinina 1 mjesec prije PHD, u vrijeme PHD, 1, 3 i 6 mjeseci nakon PHD BKVAN, te citološki nalaz decoy stanica u urinu i BK viremija u vrijeme PHD BKVAN. PCR analiza uzoraka krvi (serum ili plazma) provodi se s ciljem detekcije i kvantifikacije BK virusne DNA. U dijagnostici i probiru koristio se kvantitativni PCR test – real time PCR (TaqMan™). IS terapija održavanja se sastojala od takrolimusa ili ciklosporina, mikofenolat mofetila MMF-a ili azatioprina, sa ili bez steroida. BKVAN je liječena smanjivanjem IS i visokom dozom intravenskih imunoglobulina (2 g/kg).

### **6.2 Praćenje i prikupljanje podataka**

Svi podaci o PHD, vrijednostima kreatinina, dozi MMF-a i koncentraciji takrolimusa prikupljeni su iz medicinske dokumentacije i povijesti bolesti baze podataka transplantiranih bolesnika Zavoda za nefrologiju u KB „Merkur“. Prikupljene su vrijednosti kreatinina 1 mjesec prije PHD, u vrijeme PHD, te 1, 3 i 6 mjeseci nakon PHD. Podaci o citološkoj obradi urina u svrhu otkrivanja prisutnosti BK virusnih inkluzija urotela dokazivanjem „decoy“

stanica dobiveni su iz arhive citološkog laboratorija Zavoda za kliničku citologiju i citogenetiku KB „Merkur“. Podaci o broju kopija virusne DNA u krvi pri dokazivanju reaktivacije BK virusne replikacije u krvi metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) dobiveni su iz arhive Kliničkog Zavoda za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC „Zagreb“. Traženi su podaci o citologiji urina i PCR, vremenski podudarni s datumom PHD. Radi nepotpunih podataka i neredovitog praćenja 4 bolesnika (n=1 s BKVAN, n=3 iz kontrolne skupine) su isključena iz obrade svih drugih parametara, osim ishoda transplantiranog bubrega.

### **6.3 Statistička analiza**

Statistička obrada podataka izvedena je u programu STATISTICA 10, StatSoft i MedCalc. U statističkoj obradi podataka koristio se Kolmogorov Smirnov kojim se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika vrijednosti dvije ispitivane kontinuirane neparametrijske varijable. Učinjena je Kaplan – Meireova analiza preživljenja bolesnika i bubrežnog presatka od datuma transplantacije do završetka praćenja (datum gubitka bubrega, smrti bolesnika, ili na datum 22.03.2013.) te preživljenja bolesnika i bubrežnog alografta od datuma postavljanja PHD BKVAN do završetka praćenja.  $P < 0.05$  smatran je statistički značajnim.

## 7. REZULTATI

### 7.1 Osobine ispitanika

**Tablica 1:** Demografske karakteristike ispitanika

	<i>BKVAN+</i> n=16	<i>BKVAN-</i> n=29	<i>p</i>
<b>Dob, median (IQR)</b>	38(32-60)	53(43-59)	NS*
<b>Spol, n (%)</b>			
Muški	11 ( 73.33)	17 (58.62)	NS**
Ženski	4 (26.67)	12 (41.48)	NS**
<b>Tip donora, n (%)</b>			
Umrli	13 (83.33)	25 (86.21)	NS**
Živi	2 (13.67)	4 (13.79)	NS**
<b>Tip transplantacije, n (%)</b>			
Bubreg	12 (80)	24 (82.76)	NS**
Bubreg + jetra	1 (6.67)	0	NS**
Bubreg + gušterača	2 (13.33)	5 (17.24)	NS**
<b>Steroidi, n (%)</b>	13 (86.67)	21 (72.41)	NS**
<b>MMF, n (%)</b>	14 (93.33)	29 (100.00)	NS**
<b>Takrolimus, n (%)</b>	13 (86.67)	29 (100.00)	NS**
<b>Ukupna HLA nepodudarnost</b>	3.92	3.48	NS*

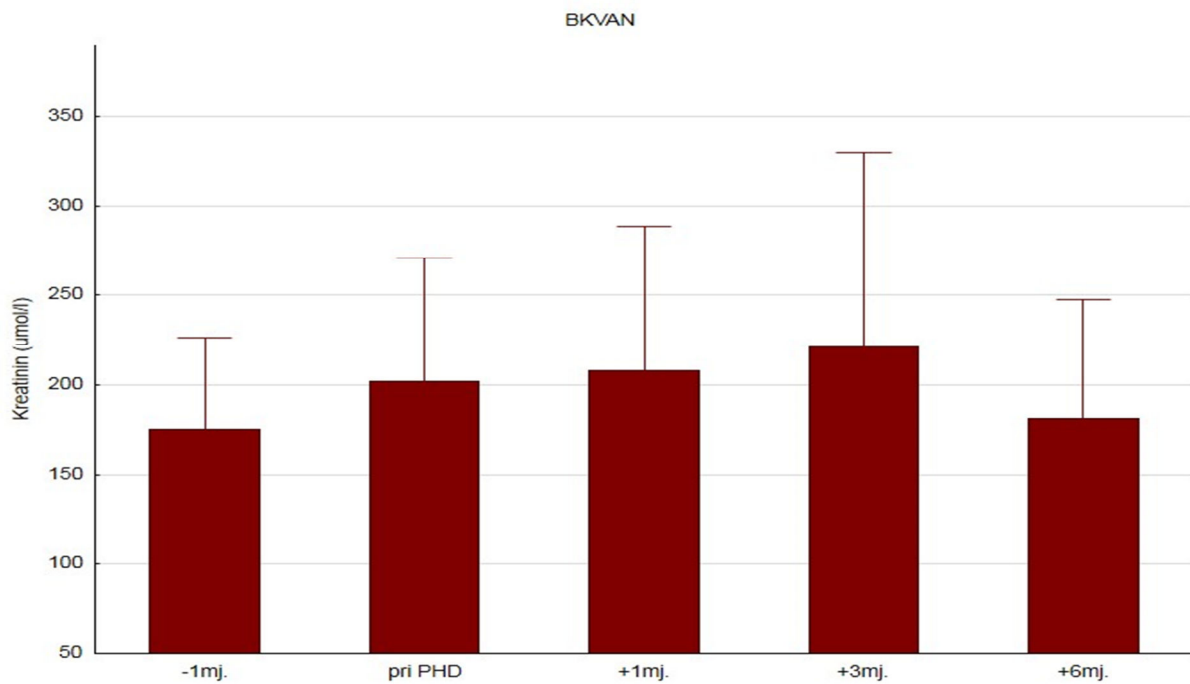
Kratice: BKVAN = BK virusna nefropatija; MMF=mikofenolat mofetil; HLA= humani leukocitni antigen; IQR = interkvartilni raspon; \*, Kolmogorov-Smirnov test ; \*\*,  $\chi^2$  test



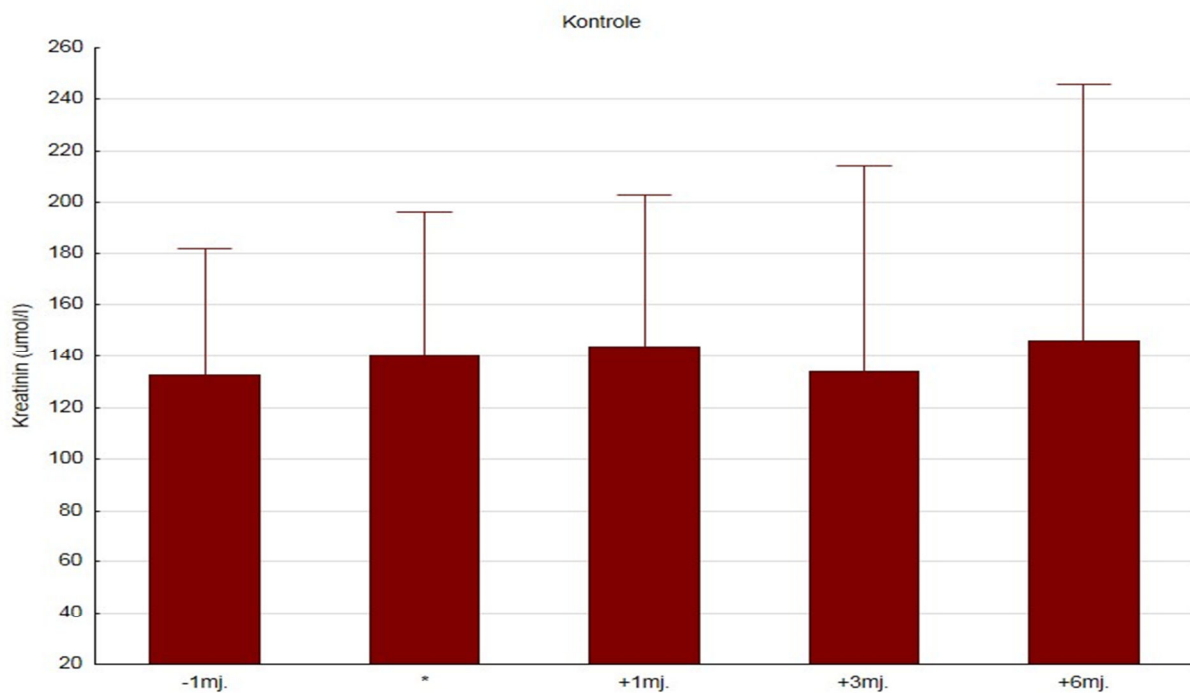
Medijan praćenja od datuma transplantacije iznosio je 1054 (300-3573) dana za bolesnike s BKVAN i 855 (38-3491) dana za kontrolne ispitanike ( $\chi^2$  test;  $p=0.30$ ). BKVAN je dijagnosticirana u 16 bolesnika s medijanom dobi od 38 (19-65) godina. U kontrolnih ispitanika s presađenim bubregom bez BKVAN medijan dobi bio je 53 (30-71) godina. Bolesnici s BKVAN i kontrolni ispitanici nisu se značajno razlikovali prema dobi ( $p=0.211$ ) ni u ukupnoj HLA nepodudarnosti ( $p=0.452$ ). Nije pronađena značajna razlika u tipu donora ( $p=0,967$ ) i tipu transplantacije ( $p=0,962$ ) između promatranih skupina. U skupini bolesnika s BKVAN, 13 transplantacija je izvedeno s umrlih donora, u 2 sa živućih donora, dok je u kontrolnoj skupini izvedeno 25 od 29 transplantacija s umrlih donora. Od 29 kontrolnih ispitanika 5 ih je imalo istovremeno transplantiranu gušteraču i bubreg. U skupini s BKVAN jednom bolesniku je istovremeno transplantiran bubreg i jetra, a u dvoje bolesnika bubreg i gušterača. IS terapija održavanja se sastojala od takrolimusa, MMF i steroida u 33 bolesnika, od takrolimusa i MMF u 9, ciklosporina, MMF i steroida u 2 bolesnika, dok je jedan bolesnik primao takrolimus, azatioprin i steroide. Vrsta IS terapije između obje skupine nije pokazala značajnu razliku. U skupini s BKVAN 2 (13.33%) bolesnika je uzimalo ciklosporin i 1 (6.67%) bolesnik je uzimao azatioprin. U kontrolnoj skupini svi ispitanici su uzimali takrolimus i MMF, dok ih 8 (27.59%) nije uzimalo kortikosteroide.

## **7.2 Bubrežna funkcija unutar pojedine skupine ispitanika**

Pronađena je značajna statistička razlika (Kolmogorov-Smirnov test) između promatranih skupina (viša vrijednost kreatinina u bolesnika s BKVAN) u praćenju serumskih vrijednosti kreatinina 1 mjesec prije PHD ( $p< 0.025$ ), u vrijeme PHD ( $p<0.005$ ) i 3 mjeseca nakon PHD ( $p<0.025$ ), no razlika u vrijednostima kreatinina nije značajna za 1 mjesec i 6 mjeseci nakon PHD (tablica 2, slika 3). Unutar pojedine od dvije skupine bolesnika slučajeva i kontrola nije utvrđena značajna statistička razlika u srednjim vrijednostima serumskog kreatinina 1 mjesec, pri PHD BKVAN, 1, 3 i 6 mjeseci nakon PHD BKVAN, iako se mogu uočiti veći rasponi u vrijednostima kreatinina kod bolesnika s BKVAN, nego li u kontrolnih ispitanika (slika 1 i 2).



Slika 1: Serumske vrijednosti kreatinina za skupinu bolesnika s PHD BKVAN; Srednja vrijednost  $\pm$  SD; p=NS u odnosu na -1 mj. Kolmogorov-Smirnov test

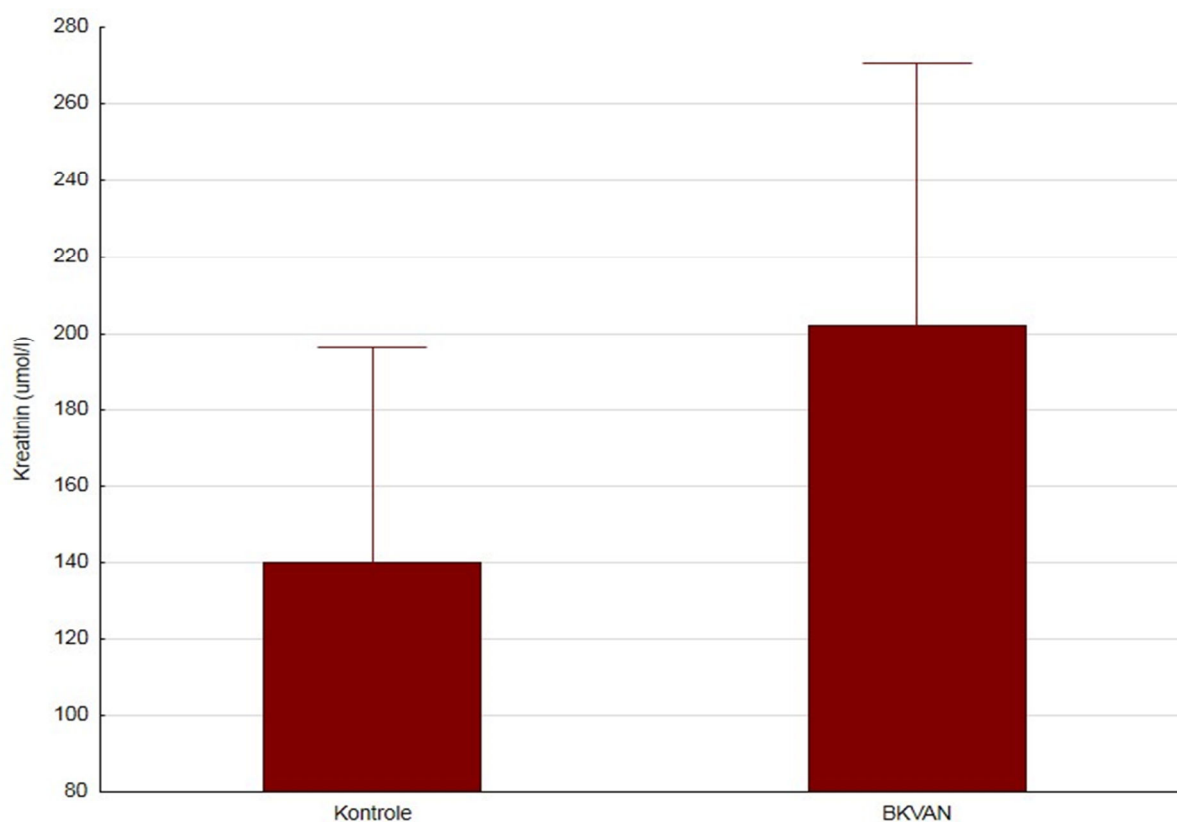


Slika 2: Serumske vrijednosti kreatinina za kontrolnu skupinu ispitanika bez BKVAN; Srednja vrijednost  $\pm$  SD; p=NS u odnosu na -1mj. Kolmogorov-Smirnov test, \*, vrijeme podudarno s PHD bolesnika s BKVAN

Tablica 2: Prikaz srednjih vrijednosti kreatinina

<i>Serumski kreatinin (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</i>			
<i>Srednja vrijednost <math>\pm</math>SD</i>			
	<i>BKVAN+</i>	<i>BKVAN-</i>	<i>p</i> *
1 mj. prije PHD, n	175.38 $\pm$ 50.78, 13	132.75 $\pm$ 49.43, 24	< 0.025
Pri PHD, n	202.13 $\pm$ 68.51, 15	140.09 $\pm$ 56.14, 23	<0.005
1 mj. nakon PHD, n	207.93 $\pm$ 80.84, 12	143.91 $\pm$ 58.72, 21	NS
3 mj. nakon PHD, n	221.29 $\pm$ 108.67, 12	134 $\pm$ 80.43, 20	<0.025
6 mj. nakon PHD, n	181.5 $\pm$ 66.24, 12	146.1 $\pm$ 99.79, 20	NS

\*Kolmogorov-Smirnov test



Slika 3: Razlika u koncentraciji serumskih kreatinina na dan PHD BKVAN između bolesnika BKVAN i kontrolne skupine; Srednja vrijednost  $\pm$  SD , \*\* $p$ <0.01, Kolmogorov-Smirnov test

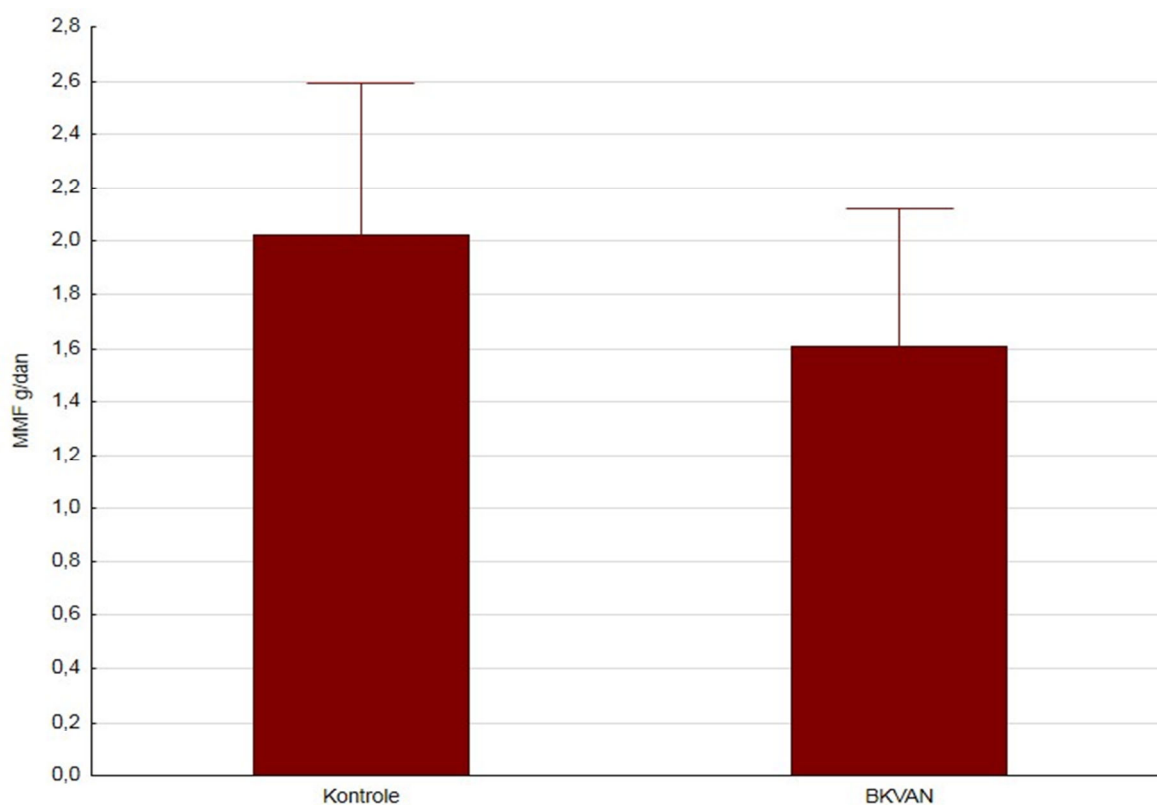
### 7.3 Obilježja imunosupresivnog liječenja

U vrijeme PHD BKVAN nije pronađena značajna statistička razlika ( $p > 0.10$ ) u koncentracijama takrolimusa i dozi MMF između bolesnika s BKVAN i skupine bolesnika bez BKVAN (tablica 3, slika 4 i 5).

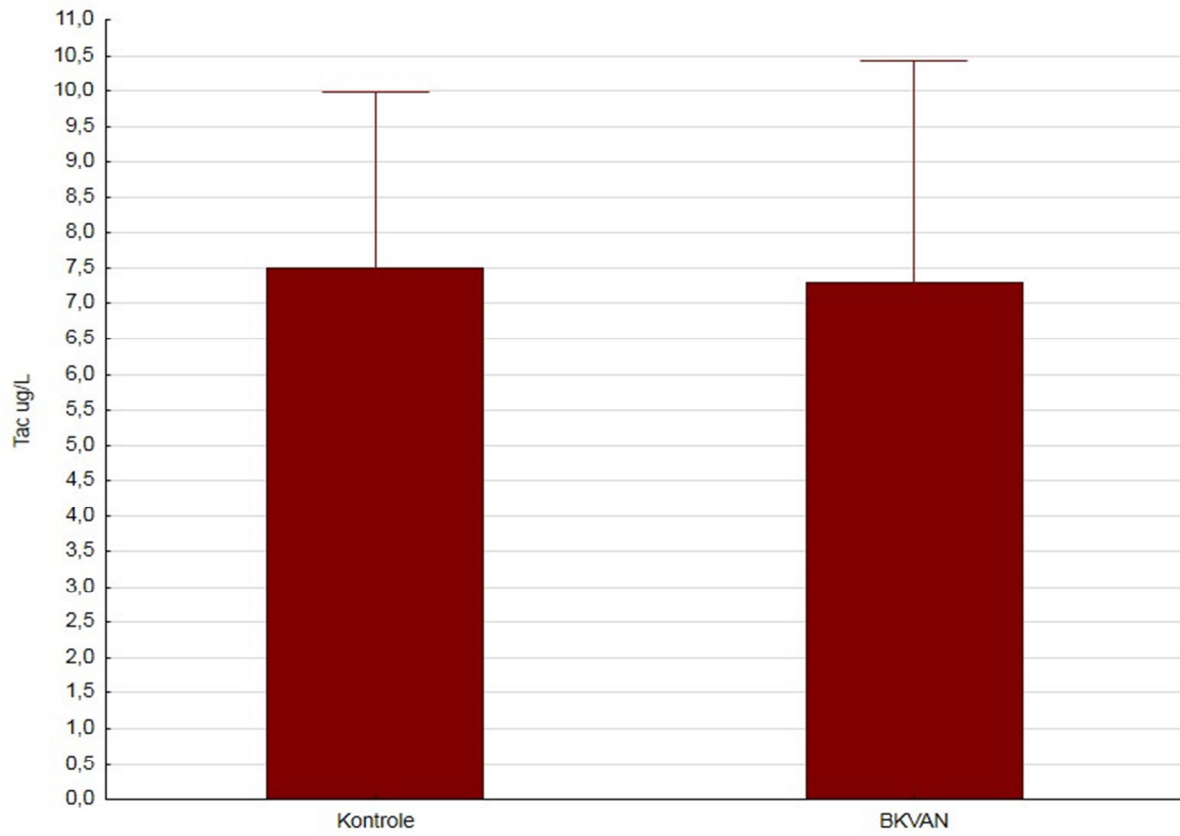
Tablica 3: Prikaz srednjih vrijednosti imunosupresivnih lijekova

	<i>BKVAN+</i>	<i>BKVAN-</i>	<i>p</i> *
Takrolimus (ug/L) pri PHD, n	7.492±3.183, 12	7.491±2.484, 23	NS
MMF (g/dan) pri PHD, n	1.607±0.516, 14	2.023±0.572, 22	NS

\*Kolmogorov-Smirnov test



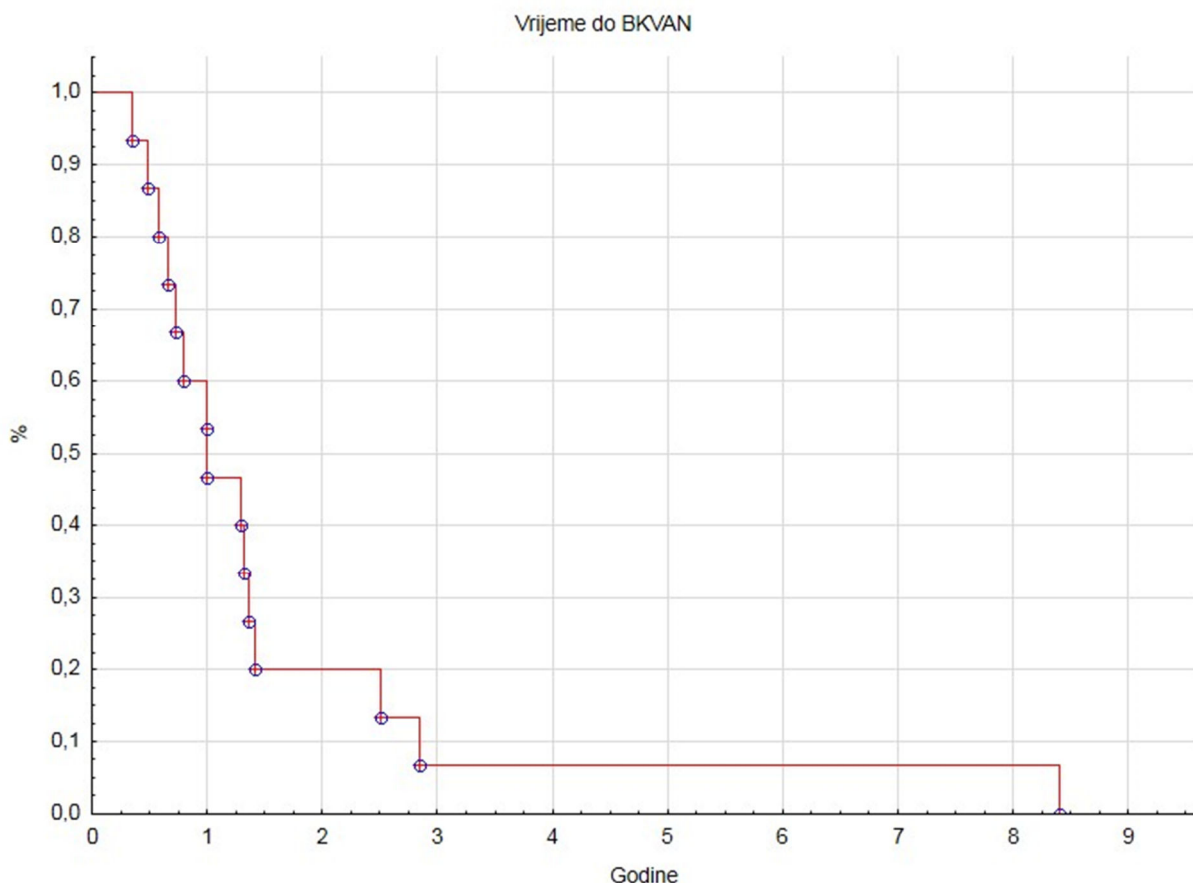
Slika 4: Razlika u dnevnoj dozi mikofenolat mofetila (MMF) u vrijeme PHD BKVAN između bolesnika s BKVAN i kontrolne skupine; Srednja vrijednost ± SD;  $p = NS$  Kolmogorov-Smirnov test



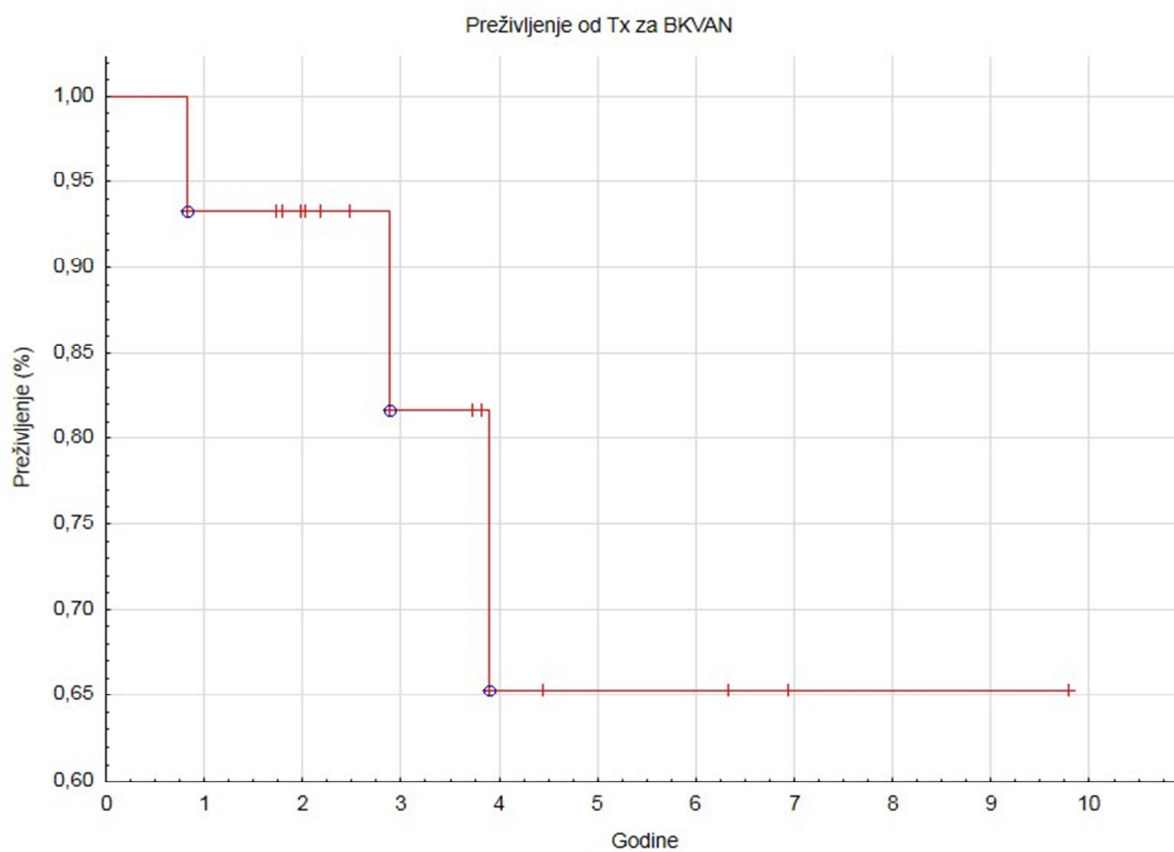
Slika 5: Razlika u koncentracijama takrolimusa u vrijeme PHD BKVAN između bolesnika s BKVAN i kontrolne skupine; Srednja vrijednost  $\pm$  SD;  $p=NS$  Kolmogorov-Smirnov test

#### 7.4 Analiza ishoda bubrežnog presatka

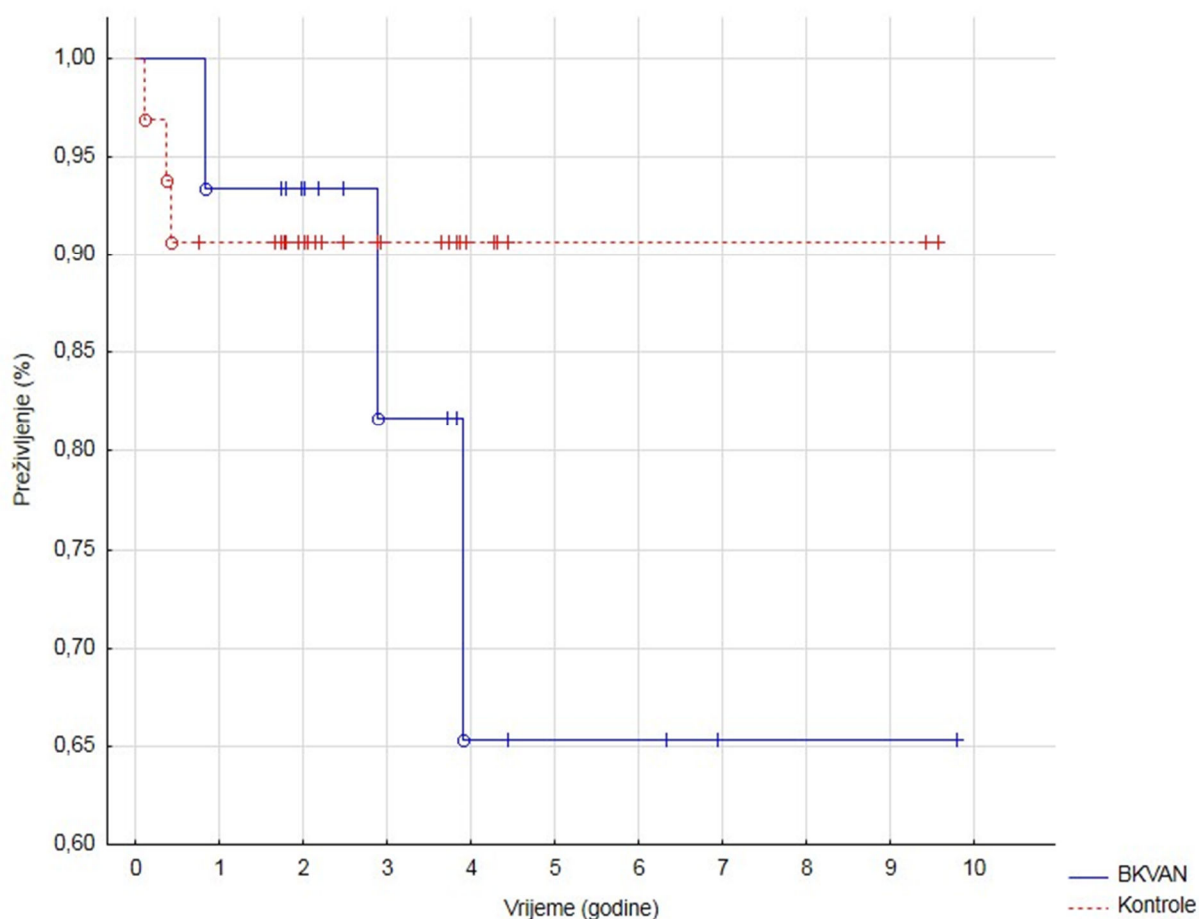
Medijan do patohistološke dijagnoze (PHD) BKVAN bio je 366 (130-3065) dana. U 54.1% bolesnika BKVAN je nastupila u prvoj godini nakon transplantacije, dok u 80% bolesnika unutar dvije godine od transplantacije (slika 6). Nakon postavljanja PHD BKVAN ispitanici su imali medijan praćenja od 311 (32-1898) dana. Jedan je bolesnik u tom razdoblju umro, a dvoje je izgubilo bubrežni presadak. Ukupno preživljenje u pet i deset godina praćenja nakon postavljanja dijagnoze bilo je 65.3% (Kaplan-Meier). Nije pronađena značajna statistička razlika (log-rank test,  $p=0.44$ ) u preživljenju bubrežnog presatka između bolesnika s PHD BKVAN i kontrolne skupine ispitanika s presađenim bubregom u kojoj je preživljenje presatka i bolesnika u istom razdoblju iznosilo 90.6%. U 3 bolesnika iz kontrolne skupine došlo je do gubitka bubrežnog presatka i smrtnog ishoda unutar prve godina nakon transplantacije (slika 7 i 8).



Slika 6: Vrijeme od transplantacije do patohistološke dijagnoze BK virusne nefropatije Kaplan-Meier



Slika 7: Preživljenje presatka od transplantacije s patohistološkom dijagnozom BKVAN; unutar 10 godina praćenja 3 bolesnika su izgubila bubrežni presadak, uključujući jedan smrtni ishod nakon patohistološke dijagnoze BKVAN; Kaplan-Meier



Slika 8:Usporedba preživljenja presatka između bolesnika s BKVAN i kontrolne skupine ispitanika. Preživljenje je uspoređeno log-rank testom(kontrola vs. BKVAN;  $p=0,44$ ); Kaplan-Meier

### 7.5 Dijagnostički testovi za dokazivanje BK virusne reaktivacije u vrijeme patohistološke dijagnoze

Iz analize vrijednosti citologije urina kao dijagnostičkog testa za dokazivanje BKVAN isključen je 1 bolesnik iz kontrolne skupine radi nedostatka podataka, a iz analize vrijednosti dijagnostičkog testa lančane reakcije polimerazom (PCR) isključena su 3 bolesnika s BKVAN i 2 bolesnika iz kontrolne skupine ispitanika. Citološki nalaz decoy stanica u vrijeme PHD bio je pozitivan u 73.3% bolesnika s BKVAN. Iz kontrolne skupine bolesnika 10.71% ispitanika imalo je pozitivni nalaz decoy stanica u urinu ( $\chi^2$  test;  $p<0.0001$ ). Značajna BK virusna replikacija u krvi dokazana je metodom PCR u 100% pacijenata s patohistološkom dijagnozom BKVAN te u 22.22% bolesnika bez BKVAN. Vrijednosti dijagnostičkih testova



citologije urina i PCR krvi u vrijeme dijagnoze BKVAN pokazuju značajnu statističku razliku ( $\chi^2$  test;  $p < 0.0001$ ) između skupine bolesnika s BKVAN i kontrolne skupine bolesnika bez BKVAN (tablica 4).

Specifičnost za BKVAN citologije urina s nalazom decoy stanica iznosila je 89.29% a specifičnost metode PCR krvi iznosila je 77.78% (tablica 5).

Tablica 4: Značaj dijagnostičkih testova za BKVAN

	<b>BKVAN +</b>	<b>BKVAN-</b>	<b>p*</b>
<b>Citologija urina</b>	<b>n=15</b>	<b>n=28</b>	<b>&lt;0.0001</b>
Decoy+	11	3	
Decoy -	4	25	
<b>Krv</b>	<b>n=12</b>	<b>n=27</b>	<b>&lt;0.0001</b>
PCR+	12	6	
<b>PCR-</b>	<b>0</b>	<b>21</b>	

\*P =  $\chi^2$  test

Tablica 5: Prikaz vrijednosti dijagnostičkih testova za BKVAN

	<b>Citologija urina (nalaz decoy stanica)</b>	<b>PCR</b>
Osjetljivost	73.33% 95% CI: 44.91 % - 92.05 %	100% 95% CI: 73.35 % - 100.00%
Specifičnost	89.29% 95% CI: 71.75 % - 97.61 %	77.78% 95% CI: 57.73 % - 91.32 %
Pozitivna prediktivna vrijednost	78.57% 95% CI: 49.21 % - 95.09 %	66.67% 95% CI: 41.01 % - 86.58 %
Negativna prediktivna vrijednost	86.21% 95% CI: 68.32 % - 96.03 %	100% 95% CI: 83.75 % - 100.00 %

## 8. RASPRAVA

U ovom radu istražili smo ishod i preživljenje grafta nakon pojave BK virusne replikacije s razvojem nefropatije nakon desetogodišnjeg praćenja u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika bez BKVANte vrijednost pojedinog dijagnostičkog test za BKVAN. Iako brojčano različita, statistički neznčajna razlika ( $p=0.44$ ) u preživljenju presađenog bubrega između skupine bolesnika s BKVAN (65.3%) i kontrolne skupine ispitanika (90.6%) može se pripisati malom uzorku uključenih bolesnika tijekom desetogodišnjeg praćenja od 2003 do ožujka 2013. godine. Troje bolesnika iz kontrolne skupine izgubilo je bubrežni presadak unutar prve godine od transplantacije. Prema literaturi gubitak presađenog bubrega radi BKVAN seže do 70% (Brennan *et al.* 2005), čime BK virus postaje značajan problem u održavanju funkcije presatka u suvremenoj transplantaciji. U Kliničkoj bolnici „Merkur“ presađeno je 206 bubrega, izolirano ili istovremeno s jetrom i gušteračom u periodu od 2003. do rujna 2009. godine te je samo u 3 bolesnika postavljena patohistološka dijagnoza BKVAN (1.3%). Od 2007. god. promijenjen je IS protokol s većom učestalošću uporabe takrolimusa, što je moglo pridonijeti povećanju incidencije BKVAN u KB „Merkur“. Od iste godine obavlja se citološki probir urina i protokolarne bipsije presađenih bubrega, a dostupan je i PCR, dijagnostički test za utvrđivanje BK viremije od rujna 2009. godine (Kovačević Vojtušek *i sur.* 2010). Predložene su dvije metode probira i interventnih protokola. Prvi način se temelji na citološkom probiru urina s vrednovanjem bioptičkog materijala presađenog bubrega kada su prisutne decoy stanice u urinu ili je izražena viremija neovisno o bubrežnoj funkciji (Drachenberg *et al.* 2001). Takvim pristupom postoji mogućnost prepoznavanja BK virusne nefropatije u ranoj fazi nastanka, ali radi multifokalnog obrasca u bubrežnom parenhimu, mogući je i veći postotak lažno negativnih rezultata bipsije presađenog bubrega u viremičnih bolesnika sa subkliničkom slikom bolesti. Drugi pristup uzima u obzir kvantitativno određivanje BK replikacije, odnosno viremije s uvjerljivim promjenama vrijednosti titra pri smanjenju IS liječenja bez izvođenja bipsije presađenog bubrega (Brennan *et al.* 2005). U ovom slučaju problem je rizik većeg postotka akutnog odbacivanja presatka. Za oba pristupa postoji opravdano pitanje odnosa troška i koristi u svrhu probira rizičnih bolesnika, naročito u centrima s niskom incidencijom BKVAN s teškom dostupnošću PCR-u. U ovom istraživanju osjetljivost PCR testa za BKVAN bila je 100%, a specifičnost PCR za BKVAN iznosila je 77.78%. Rezultati su bliski istraživanju iz 2005. godine (Hirsch *et al.* 2005), u kojem je osjetljivost također bila 100% s nešto višom specifičnošću testa od 88% za BKVAN. RT-PCR može detektirati BKV DNA u puno manjoj količini nego što je to moguće in situ

hibridizacijom ili imunohistokemijom. Iako numeričke granične vrijednosti u smislu virusnog opterećenja (broj kopija BK virusne DNA po mL uzorka) nisu precizno utvrđene, trenutno u literaturi postoji generalni konsenzus da perzistentna BK viremija  $>10^4$  kopija DNA/mL predstavlja rizični čimbenik u smislu nastanka odnosno progresije BKVAN (Hirsch *et al.* 2005; Randhawa *et al.* 2005). Radi neredovitog praćenja u našem slučaju nije bilo podataka za 3 bolesnika s BKVAN i 2 kontrolnih ispitanika u odgovarajućem vremenskom periodu. Osjetljivost citološkog nalaza decoy stanica u urinu iznosila je 73.33% a specifičnost 89.29%. Od 15 bolesnika s BKVAN, 3 nije imalo nalaz decoy stanica, dok u kontrolnoj skupini ispitanika bez BKVAN 25 od 28 bolesnika nije imalo nalaz decoy stanica u urinu, što govori u prilog značajnosti citologije urina kao jeftine dijagnostičke metode u prepoznavanju BK virusne reaktivacije u rizičnih bolesnika. PCR kao pouzdaniju, ali skuplju metoda probira potrebno je redovito koristiti svakog mjeseca u prvih 6 mjeseci nakon transplantacije, svaka 2 mjeseca idućih 6 mjeseci te nakon isteka prve godine jednom u godini prema preporukama (Gracin *et al.* 2010). Potrebna je analiza probirnih dijagnostičkih testova za pravovremeno prepoznavanje BK viremije i virurije, kao i njihovo redovno provođenje.

Serumski kreatinin kao prediktivni čimbenik za BKVAN pokazao se značajnim u praćenju transplantiranih bolesnika, naročito 1 mjesec prije te u vrijeme postavljanja patohistološke dijagnoze. Statistička značajnost pronađena je samo za 3. mjesec ( $p < 0.025$ ) nakon dijagnoze BKVAN.

Ovo istraživanje nije pokazalo značajnu statističku razliku u koncentracijama takrolimusa i dozi MMF-a u vrijeme dijagnoze između bolesnika s PHD BKVAN i kontrolne skupine transplantiranih ispitanika, kako se očekuje prema raspravama o kombinaciji takrolimusa i mikofenolata kao rizičnog čimbenika za BKVAN (Acott & Babel 2012). Srednja vrijednost takrolimusa ( $\mu\text{g/L}$ ) u vrijeme PHD za 12 bolesnika s BKVAN iznosila je  $7.492 \pm 3.183$  te  $7.491 \pm 2.484$  za 23 kontrolna ispitanika. Srednje vrijednosti doze mikofenolata ( $\text{g/dan}$ ) pri PHD iznosile su  $1.607 \pm 0.516$  za 14 bolesnika s BKVAN i  $2.023 \pm 0.572$  za 22 kontrolna ispitanika. U skupini s BKVAN dvoje bolesnika je primalo ciklosporin i 1 bolesnika je primao azatioprin uz steroide, dok su svi bolesnici u kontrolnoj skupini primali kombinaciju takrolimusa i mikofenolata s ili bez steroida. Potrebna je analiza IS lijekova većeg broja bolesnika tijekom dužeg vremenskog perioda te prije PHD BKVAN, kao i analiza reakcije na smanjenje IS i primjenu intravenskih imunoglobulina. Prema istraživanju incidencije BK replikacije, najviše vrijednosti viremije pronađene su u kombinaciji takrolimusa i MMF-a, a najniže i kombinaciji MMF-a s ciklosporinom (Brennan *et al.* 2005).

## **9. ZAKLJUČAK**

BKVAN je važna infektivna komplikacija transplantacije bubrega, koja uz ranu dijagnozu i kontrolu funkcije presađenoga bubrega u velikom postotku bolesnika ne mora dovesti do gubitka bubrega. Protokolarnе i indikacijske biopsije te PHD koja je zlatni standard u otkrivanju BKVAN u kombinaciji s ranim otkrivanjem virurije i viremije temelj su očuvanja funkcije bubrežnog presatka. Citologija urina s nalazom decoy stanica predstavlja važan test probira bolesnika s rizikom za BKVAN. Potrebna su prospektivna istraživanja s duljim praćenjem kako bi se utvrdio učinak pojedine vrste IS liječenja na dugoročni ishod presatka.

## 10. ZAHVALE

*Posebnu zahvalu upućujem učitelju i mentoru izv. prof. dr. sc. Mladenu Knoteku na suradnji, stručnim savjetima, strpljivoj pomoći i prenesenom znanju u statističkoj obradi podataka te nesebičnoj pomoći djelatnika Zavoda za nefologiju KB „Merkur“ kao i svima koji su na bilo koji način nesebično doprinijeli pri izradi ovoga diplomskoga rada.*

*Zahvaljujem se svojim roditeljima i obitelji na nesebičnoj podršci pruženoj tijekom šestogodišnjeg studija.*

*Za kraj, zahvaljujem se svim prijateljima koji su studentski život učinili posebnijim.*

## 11. LITERATURA

Acott P, Babel N, (2012) BK replication following kidney transplant: Does the choice of immunosuppressive regimen influence outcomes?; *Ann Transplant* 17(1):86-99

Binet I, Nickeleit V, Hirsch H (2000) Polyomavirus infections in transplant recipients; *Curr Opin Organ Transplant* 5:210-216

Blake K, Pillay D, Knowles W, Brown DW, Griffiths PD, Taylor B (1992) JC virus associated meningoencephalitis in an immunocompetent girl; *Arch Dis Child* 67(7):956-957

Bofill-Mas S, Pina S, Girones R (2000) Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage; *Appl Environ Microbiol* 66:238-245

Brennan DC, Agha I, Bohl DL, Schnitzler MA, Hardinger KL, Lockwood M, Torence S, Schuessler R, Robby T, Gaudreault-Keener M, Storch GA (2005) Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction; *Am J Transplant* 5(3):582-94

Chatterjee M, Weyandt TB, Frisque RJ (2000) Identification of archetype and rearranged forms of BK virus in leukocytes from healthy individuals; *J Med Virol* 60:353-362

Coleman DV, Mackenzie EF, Gardner SD, Poulding JM, Amer B, Russell WJ (1978) Human polyomavirus (BK) infection and ureteric stenosis in renal allograft recipients; *J Clin Pathol* 31:338-347

Costa C, Cavallo R, (2012) Polyomavirus-associated nephropathy; *World J Transplant* 2(6): 84-94

Drachenberg RC, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Ramos E, Fink JC, Walli R, Weir MR, Cangro CB, Klassen DK, Khaled A, Cunningham R, Bartlett ST (2001) Morphological Spectrum of Polyoma Virus Disease in Renal Allografts: Diagnostic Accuracy of Urine Cytology; *Am J Transplant* 1(4): 373-381

Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hirsch HH, Wali R, Crowder C, Nogueira J, Cangro CB, Mendley S, Mian A, Ramos E (2004) Histological patterns of polyomavirus nephropathy: correlation with graft outcome and viral load; *Am J Transplant* 4(12): 2082

Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B (1971) New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation; *Lancet* 1(7712):1253-1257

Gardner SD, MacKenzie EF, Smith C, Porter AA (1984) Prospective study of the human polyomaviruses BK and JC and cytomegalovirus in renal transplant recipients; *J Clin Pathol* 37:578-586

Ginevri F, De Santis R, Comoli P, Pastorino N, Rossi C, Botti G, Fontana I, Nocera A, Cardillo M, Ciardi MR, Locatelli F, Maccario R, Perfumo F, Azzi A (2003) Polyomavirus BK infection in pediatric kidney-allograft recipients: a singlecenter analysis of incidence, risk factors, and novel therapeutic approaches; *Transplantation* 75(8):1266-1270

Ginevri F, Azzi A, Hirsch HH, Basso S, Fontana I, Cioni M, Bodaghi S, Salotti V, Rinieri A, Botti G, Perfumo F, Locatelli F, Comoli P (2007) Prospective monitoring of polyomavirus BK replication and impact of pre-emptive intervention in pediatric kidney recipients; *AmJ Transplant* 7(12):2727–2735

Goudsmit J, Wertheim-van Dillen P, van Strien A, van der Noordaa J (1982) The role of BK virus in acute respiratorytract disease and the presence of BKV DNA in tonsils; *J Med Virol* 10:91-99

Gracin S, KovačevićVojtušek I, Vidas Ž, Knotek M, Kardum-Skelin I, Ljubanović D (2010) Polyomavirus Associated Nephropathy after Kidney and PancreasTransplantation: Case Report, *Coll Antropol* 34(2):623-626

Hirsch HH (2002) Polyomavirus BK nephropathy: a (re-)emerging complication in renal transplantation; *Am J Transplant*2:25-30

Hirsch HH, Steiger J, (2003) Polyomavirus BK; *Lancet Infect Dis* 3:611–23

Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ, Steiger J (2002) Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients; *N Engl J Med* 347(7):488-96

Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, Ginevri F, Gordon J, Limaye AP, Mihatsch MJ, Nickeleit V, Ramos E, Randhawa P, Shapiro R, Steiger J, Suthanthiran M, Trofe J (2005) Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations; *Transplantation* 79(10):1277-86

Hirsch HH, Drachenberg CB, Steiger J, Ramos E, (2006) Polyomavirus-Associated Nephropathy in Renal Transplantation: Critical Issues of Screening and Management <http://www.landesbioscience.com/pdf/11Ahsan.pdf> pruzeto 14. travnja 2014.

Hirsch HH, Randhawa P (2013) BK polyomavirus in solid organ transplantation; *Am J Transplant* 13:179-88

Hirsch HH, Babel N, Comoli P, Friman V, Ginevri F, Jardine A, Lautenschlager I, Legendre C, Midtvedt K, Muñoz P, Randhawa P, Rinaldo CH, Wieszek A (2014) A European Perspective On Human Polyomavirus Infection, Replication And Disease In Solid Organ Transplantation; *Clin Microbiol Infect* doi: 10.1111/1469-0691.12538

Kazory A, Ducloux D, Chalopin JM, Angonin R, Fontaniere B, Moret H (2003) The first case of JC virus allograft nephropathy; *Transplantation* 76(11): 1653

Kovačević Vojtušek I, Gracin S, Knotek M, Ljubanović D, Kardum-Skelin I, Sabljarić Matovinović M (2010) First Documented Case of BK Nephropathy in Kidney Transplant Recipient in Croatia: Usage of Urine Cytology in Evaluation Process; *Coll Antropol* 34(1): 255-259

Knowles WA (2001) The epidemiology of BK virus and the occurrence of antigenic and genomic sub-types. In: Khalili K, Stoner GL, eds. *Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspectives*, New York, Wiley-Liss



Knowles WA, Pipkin P, Andrews N, Vyse A, Minor P, Brown DW, Miller E (2003) Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40; *J Med Virol* 71(1):115-123

Knowles WA (2006) Discovery and Epidemiology of The Human Polyomaviruses BK Virus (BKV) and JC <http://www.landesbioscience.com/curie/chapter/2108/> pruzeto 14. travnja 2014.

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group (2009) KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients; *Am J Transplant* 9 Suppl 3:S1-155

Murray JE, Merrill JP, Harrison JH (1958) Kidney Transplantation Between Seven Pairs of Identical Twins; *Ann Surg* 148(3): 343–357

Mengel M, Marwedel M, Radermacher J, Eden G, Schwarz A, Haller H, Kreipe H. (2003) Incidence of polyomavirus-nephropathy in renal allografts: influence of modern immunosuppressive drugs; *Nephrol Dial Transplant* 18(6):1190–96

Monaco MCG, Jensen PN, Hou J, Durham LC, Major EO. (1998) Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: Evidence for site of initial viral infection; *J Virol* 72:9918-9923

Noss G (1987) Human polyoma virus type BK infection and T antibody response in renal transplant recipients; *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A* 266:567-574

Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH (1971) Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy; *Lancet* 1(7712):1257-1260

Penta M, Lukic A, Conte MP, Fioriti D, Longhi C, Pietropaolo V, Vetrano G, Villaccio B, Degener AM, Seganti L (2003) Infectious agents in tissues from spontaneous abortions in the first trimester of pregnancy; *New Microbiol* 26(4):329-37

Petrogiannis-Halioitis T, Sakoulas G, Kirby J, Koralnik IJ, Dvorak AM, Monahan-Earley R, DE Girolami PC, DE Girolami U, Upton M, Major EO, Pfister LA, Joseph JT (2001) BK-related polyomavirus vasculopathy in a renal-transplant recipient; *N Engl J Med* 345(17):1250-1255

Pietro Paolo V, Di Taranto C, Degener AM, Jin L, Sinibaldi L, Baiocchini A, Melis M, Orsi N (1998) Transplacental transmission of human polyomavirus BK; *J Med Virol* 56(4):372-6

Puretić Z, Knotek M (2008) *Transplantacija bubrega*; Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B, *Interna medicina*, Zagreb, Naklada Ljevak

Ramos E, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hamze O, Fink JC, Klassen DK, Drachenberg RC, Wiland A, Wali R, Cangro CB, Schweitzer E, Bartlett ST, Weir MR (2002) Clinical course of polyoma virus nephropathy in 67 renal transplant patients; *J Am Soc Nephrol* 13:2145-51

Ramos E, Drachenberg CB, Wali R, Hirsch HH (2009) The decade of polyomavirus BK-associated nephropathy: state of affairs; *Transplantation* 87:621–630

Randawa R, Vats A, Shapiro R (2006) The Pathobiology of Polyomavirus Virus Infection in Man <http://www.landesbioscience.com/curie/chapter/2108/> pruzeto 14. travnja 2014.

Schachtner T, Müller K, Stein M, Diezemann C, Seifrin A, Babel N, Reinke P (2011) BK virus-specific immunity kinetics: a predictor of recovery from polyomavirus BK-associated nephropathy; *Am J Transplant* 11(11):2443–2452

Seth P, Diaz F, Major EO (2003) Advances in the biology of JC virus and induction of progressive multifocal leukoencephalopathy; *J Neurovirol* 9:236-246

Shah KV (2000) Human polyomavirus BKV and renal disease; *Nephrol Dial Transpl* 15:754-755

Sayegh MH, Carpenter CB (2004) Transplantation 50 years later--progress, challenges, and promises; *N Engl J Med* 351(26):2761-6

Sood P, Senanayake S, Sujeet K, Medipalli R, Van-Why SK, Cronin DC, Johnson CP, Hariharan S (2013) Donor and recipient BKV-specific IgG antibody and posttransplantation BKV infection: a prospective single-center study; *Transplantation* 95(6): 896

Trofe J, Gordon J, Roy-Chaudhury P, Koralnik IJ, Atwood WJ, Alloway RR, Khalili K, Woodle ES (2004) Polyomavirus nephropathy in kidney transplantation; *Prog Transplant* 14(2):130-40

Zhou W, Sharma M, Martinez J, Srivastava T, Diamond DJ, Knowles W, Lacey SF (2007) Functional characterization of BK virus-specific CD4<sup>+</sup> T cells with cytotoxic potential in seropositive adults; *Viral Immunol* 20:379–388

Weiss AS, Gralla J†, Chan L, Klem P, Wiseman AC (2008) Aggressive Immunosuppression Minimization Reduces Graft Loss Following Diagnosis of BK Virus-Associated Nephropathy: A Comparison of Two Reduction Strategies; *Clin J Am Soc Nephrol* 3(6):1812-9

## 12. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 06. listopada 1989. godine u Zagrebu kao prvo od četvero djece u obitelji. Nakon osnovne škole 2004. godine upisujem II gimnaziju u Zagrebu. Nakon odličnog uspjeha u gimnaziji i položene mature 2008. godine upisujem Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Bila sam članica rukometnog kluba „Sesvete“ a kasnije i rukometne ekipe II gimnazije i Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Uz redovno obrazovanje pohađam Plesni Centar Zagreb i Školu stranih jezika „Sova“. Jedno od prvih akademskih izazova bilo je radno mjesto stručnog voditelja na izložbi „Bodies Revealed“ 2010. godine u organizaciji Gigart d.o.o. u Klovićevim dvorima. Od ak. god. 2010./2011. do danas demonstrator sam na Zavodu za medicinsku kemiju i biokemiju, te na Katedri Temelji neuroznanosti Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Protekle akademsku godinu 2013./2014. obavljala sam dužnost demonstratora na Katedri za pedijatriju KBC Zagreb Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Kao aktivni član Studentske sekcije za neuroznanost, od ak. god. 2012./2013. godine postajem suvoditeljem iste. S kolegama iz vodstva sekcije 2013. godine sudjelujem u osnivanju te postajem jednom od odgovornih u uredništvu web izdanja studentskog časopisa „Gyrus“, službenog glasila Studentske sekcije za neuroznanost. Svoje zanimanje za transplantacijsku medicinu izrazila sam znanstvenim radom pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. M. Knoteka te aktivnim sudjelovanjem na 5. hrvatskom simpoziju o nadomještanju bubrežne funkcije s međunarodnim sudjelovanjem *DiaTransplant2012* u Opatiji od 11. do 14. listopada 2012. godine na temu BK poliomavirusne nefropatije. Kao dio vodstva Studentske sekcije za neuroznanost sudjelujem na 4. hrvatskom kongresu neuroznanosti u Zagrebu od 20. do 21. rujna 2013., nakon čega sam primljena u članstvo Hrvatskog Društva za Neuroznanost. Uz poznavanje engleskoga i njemačkoga jezika, položila sam i prvi stupanj hrvatskoga znakovnoga jezika.