



**HAL**  
open science

# Prise en charge d'une infection virale chronique (BK polyomavirus) et d'une infection virale aigue (SARS-CoV-2) dans une population de transplantés rénaux

Ilies Benotmane

► **To cite this version:**

Ilies Benotmane. Prise en charge d'une infection virale chronique (BK polyomavirus) et d'une infection virale aigue (SARS-CoV-2) dans une population de transplantés rénaux. Virologie. Université de Strasbourg, 2022. Français. NNT : 2022STRAJ121 . tel-04121738

**HAL Id: tel-04121738**

**<https://theses.hal.science/tel-04121738v1>**

Submitted on 8 Jun 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

*ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé*

INSERM UMR\_S 1109

**THÈSE** présentée par :

**Ilies BENOTMANE**

soutenue le : **29 novembre 2022**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

**Prise en charge d'une infection virale  
chronique (BK polyomavirus) et d'une  
infection virale aiguë (SARS-CoV-2) dans une  
population de transplantés rénaux**

**THÈSE dirigée par :**

**Mme FAFI-KREMER Samira**

PU-PH, université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mme CANDON Sophie**

PU-PH, université de Rouen

**M. IZOPET Jacques**

PU-PH, université de Toulouse

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M. CARAPITO Raphaël**

MCU-PH, université de Strasbourg

**INVITÉS :**

**Mme CAILLARD Sophie**

PU-PH, université de Strasbourg



## Table des matières

Liste des figures.....	5
Liste des tableaux.....	7
Liste des abréviations.....	8
<b>Introduction.....</b>	<b>10</b>
<b>Première partie : BK polyomavirus en transplantation rénale .....</b>	<b>12</b>
<b>I. Revue de la littérature sur le BKPy virus.....</b>	<b>13</b>
A. Historique et découverte .....	13
B. Classification.....	13
C. Caractéristiques du virus.....	14
D. Cycle viral.....	21
E. Histoire naturelle de l'infection à BKPyV .....	24
F. Épidémiologie.....	24
G. Les géotypes et sérotypes BKPyV.....	25
H. Réponse immunitaire anti-BKPyV .....	28
I. Principales pathologies liées au BKPyV.....	37
J. Diagnostic de la néphropathie à BKPyV .....	47
K. Traitements de la néphropathie à BKPyV .....	56
<b>II. Conclusions et objectifs du travail de thèse concernant le BKPyV .....</b>	<b>63</b>
<b>III. Les IgIV comme stratégie préventive de la réplication du BKPyV chez les transplantés de rein—Résultats d'une étude de preuve de concept.....</b>	<b>64</b>
A. Rationnel de l'étude .....	64
B. Principaux points de méthodologie .....	65
C. Principaux résultats .....	67
D. Discussion.....	71
<b>Deuxième partie : SARS-CoV-2 en transplantation rénale.....</b>	<b>85</b>
<b>I. Revue de la littérature sur le SARS-CoV-2.....</b>	<b>86</b>
A. Historique et classification .....	86
B. Caractéristiques du virus .....	88
C. Cycle viral.....	96
D. Tableaux cliniques du COVID-19 .....	98
E. Facteurs de risque de COVID-19 sévère.....	100
F. Pathogenèse du SARS-CoV-2.....	100
G. Réponse immunitaire .....	106
H. Mutation du SARS-CoV-2 et variants d'intérêt .....	119
I. Diagnostic .....	123
J. Prise en charge thérapeutique.....	125
K. Vaccin anti-SARS-CoV-2.....	129
<b>II. Conclusions et objectifs du travail de thèse concernant le SARS-CoV-2 .....</b>	<b>137</b>
<b>III. Les biomarqueurs du syndrome de relargage cytokinique prédisent la gravité et la mortalité de la maladie due au COVID-19 chez les transplantés rénaux.....</b>	<b>138</b>
A. Rationnel de l'étude .....	138



B.	Principaux résultats .....	139
C.	Principaux points de discussion .....	144
<b>IV.</b>	<b>Évaluation virologique approfondie et réponse sérologique des transplantés rénaux atteints de COVID-19 .....</b>	<b>164</b>
A.	Caractéristiques de la charge virale SARS-CoV-2 .....	164
B.	Séroconversion et cinétique de la charge virale SARS-CoV-2 .....	169
<b>V.</b>	<b>Évaluation de la réponse vaccinale anti-SARS-CoV-2 chez les transplantés rénaux.....</b>	<b>196</b>
A.	Réponse vaccinale après deux ou trois doses de vaccins et analyse détaillée des facteurs prédicteurs de cette réponse.....	196
B.	Réponse sérologique après une première dose d'un vaccin à base d'ARNm du SARS-CoV-2 chez des transplantés rénaux ayant des antécédents de COVID-19 .....	224
C.	Amélioration de la capacité de neutralisation du variant delta après une quatrième dose du vaccin Spikevax SARS-CoV-2 chez le transplanté rénal .....	230
D.	Discussion globale sur la vaccination .....	242
	<b><i>Troisième partie : conclusions et perspectives.....</i></b>	<b>247</b>
	<b>Références .....</b>	<b>250</b>
	<b><i>Annexes.....</i></b>	<b>299</b>

## Liste des figures

Figure 1. Arbre phylogénétique illustrant les relations entre les polyomavirus humains découverts à ce jour. D'après Ambalathingal et al. <sup>15</sup> -----	14
Figure 2. Microscopie électronique montrant des particules de BKPyV -----	15
Figure 3. Structure de cryo-électron microscopie du BKPyV. -----	15
Figure 4. Structure du génome du BKPyV. -----	18
Figure 5. Protéine VP1 du BKPyV. -----	20
Figure 6. Modèle du cycle de vie du BKPyV. -----	23
Figure 7. Séroprévalence par groupe d'âge du BKPyV, JCPyV et du virus simien 40 (SV40). -----	25
Figure 8. Répartition des génotypes de BKPyV et des sous-groupes de sous-type I dans les principales zones géographiques. -----	27
Figure 9. Réactivation BKPyV chez l'immunocompétent (a) et l'immunodéprimé (b) et réaction immunitaire. ---	34
Figure 10. L'évolution des titres NAb dirigés contre la souche de réplication chez les patients viruriques, virémiques et ceux avec une néphropathie à BKPyV. -----	36
Figure 11. Réplication BKPyV au niveau des cellules épithéliales tubulaires et l'urothélium vésical. D'après Hirsch et al. <sup>135</sup> -----	39
Figure 12. Facteurs de risque de réactivation BKPyV chez le transplanté rénal. -----	40
Figure 13. Mécanismes d'action des principaux immunosuppresseurs utilisés en transplantation rénale. Selon Halloran et al. <sup>157</sup> -----	41
Figure 14. Hypothèses physiopathologiques du pouvoir oncogène du BKPyV. D'après Starrett et al. <sup>186</sup> -----	46
Figure 15. Illustration de Decoy cells. -----	49
Figure 16. Agrégats tridimensionnels de polyomavirus en forme de cristaux, appelés Haufen, dans des échantillons d'urine. -----	51
Figure 17. Biopsies en série chez un transplanté rénal avec une réactivation du BKPyV. -----	52
Figure 18. Dépistage et prise en charge des patients transplantés rénaux atteints de virurie BKPyV, de virémie et de néphropathie à BKPyV. -----	56
Figure 19. Cinétique des titres de NAb chez les transplantés rénaux ayant reçu des immunoglobulines intraveineuses. -----	68
Figure 20. Courbes de Kaplan-Meier de la survie sans virémie BKPyV. -----	69
Figure 21. Courbes de Kaplan-Meier de la survie sans néphropathie à BKPyV -----	70
Figure 22. Particule de SARS-CoV en microscopie électronique. -----	87
Figure 23. Taxonomie des coronavirus humains d'après l'ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). <sup>281</sup> -----	88
Figure 24. Structure du virus SARS-CoV-2. -----	89
Figure 25. Organisation du génome du SARS-CoV-2. -----	90
Figure 26. Représentation de la protéine S trimérique du SARS-CoV-2. -----	92
Figure 27. Mécanisme d'entrée du SARS-CoV-2. -----	97
Figure 28. Cycle viral du SARS-CoV-2. D'après Yang et al. <sup>284</sup> -----	98
Figure 29. Pathogénèse du SDRA dans le COVID-19. -----	104
Figure 30. Déséquilibre de la coagulation et de la fibrinolyse lors de COVID-19 sévères. D'après Lamers et al. <sup>328</sup> -----	106
Figure 31. Réponse des lymphocytes B et des anticorps à l'infection par le SAR2-CoV-2. -----	113
Figure 32. Anticorps neutralisants dirigés contre le SARS-CoV-2 -----	118
Figure 33. Mutations de la protéine S dans les VOC. -----	119
Figure 34. Vaccin anti-SARS-CoV-2 à ARNm. -----	131
Figure 35. Vaccin anti-SARS-CoV-2 à vecteur adénovirus. -----	133
Figure 36. Associations entre les marqueurs inflammatoires sanguins et la sévérité ainsi que la mortalité du COVID-19. -----	141

<i>Figure 37. Associations entre les marqueurs sanguins de lyse cellulaire et la sévérité ainsi que la mortalité du COVID-19.</i>	142
<i>Figure 38. Associations entre les marqueurs sanguins de coagulation et la sévérité ainsi que la mortalité du COVID-19.</i>	143
<i>Figure 39. Cinétique de la charge virale du SARS-CoV-2 au niveau nasopharyngé.</i>	165
<i>Figure 40. Présence (points rouges) ou absence (points bleus) d'excrétion viable du SARS-CoV-2 (sur la base des résultats de la culture virale) par rapport aux valeurs du seuil de cycle (cycle threshold, CT) et aux jours après l'apparition des symptômes.</i>	166
<i>Figure 41. Association de l'ARNémie SARS-CoV-2 positive avec la gravité et la mortalité du COVID-19.</i>	168
<i>Figure 42. Taux d'anticorps anti-SARS-CoV-2 positif selon le délai d'apparition des symptômes</i>	170
<i>Figure 43. Cinétique des titres IgM et IgG SARS-CoV-2 testée par ELISA.</i>	171
<i>Figure 44. Diagramme de flux.</i>	199
<i>Figure 45. Répartition des 562 transplantés rénaux selon la réponse sérologique évaluée un mois après les première, deuxième et troisième doses de vaccin.</i>	200
<i>Figure 46. Analyse multivariée des facteurs prédictifs de la séroconversion après deux doses de vaccin.</i>	201
<i>Figure 47. Impact des doses et concentrations résiduelles d'immunosuppresseurs sur la séroconversion après la seconde dose de vaccin.</i>	202
<i>Figure 48. Analyse multivariée des facteurs prédictifs de la séroconversion après trois doses de vaccin.</i>	204
<i>Figure 49. Titres d'anticorps anti-RBD IgG après une dose du vaccin ARNm</i>	226
<i>Figure 50. Réponse post-quatrième dose du vaccin Spikevax</i>	234

## Liste des tableaux

<i>Tableau I. Les polymorphismes nucléotidiques et les substitutions d'acides aminés du BKPyV, permettant de classer les différents BKPyV en quatre génotypes. ....</i>	<i>26</i>
<i>Tableau II. Classification OMS des formes cliniques de COVID-19 .....</i>	<i>99</i>
<i>Tableau III. Caractéristiques des principaux variants (adapté de l'ECDC).<sup>506</sup> .....</i>	<i>120</i>
<i>Tableau IV. Variables incluses dans le score de prédiction de la réponse sérologique à la vaccination. ....</i>	<i>203</i>

## Liste des abréviations

ACE2 :	Angiotensin-Converting Enzyme 2
ADCC :	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
AT2 :	Cellules Épithéliales Alvéolaires De Type 2
ATP :	Adénosine Triphosphate
BKPyV :	Bk Polyomavirus
CLIA :	Chemiluminescence Immunoassay
COVID-19 :	Coronavirus Disease 2019
CRP :	C-Réactive Protein
DAD :	Domage Alvéolaire Diffus
DATP :	Damage-Associated Transient Progenitors
DI50 :	Dilution Inhibitrice 50
DSA :	Donor Specific Antibody
E :	Enveloppe
ELISA :	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERGIC :	Réticulum Endoplasmique-Compartment Intermédiaire De Golgi
GVH :	Greffon Versus L'Hôte
HCoV :	Human Coronavirus
HEK :	Human Embryonic Kidney
HLA :	Human Leukocyte Antigen
HRPTEC :	Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells
HSC70 :	Heat Shock Cognate 70
HSP70 :	Heat Shock Protein 70
IFN :	Interféron
IgIV :	Immunoglobulines Intraveineuses
IL :	Interleukine
IMDPH :	Inosine 5' Monophosphate Deshydrogénase
ISG :	Interferon Stimulated Gene
JAK :	Janus Kinase
JCPyV :	JC Polyomavirus
KIR :	Killer-Cell Immunoglobulin-Like Receptors
LFA :	Lateral Flow Assay
LTA :	Large T antigen
MBCD :	Méthyl-Béta-Cyclodextrine
MDA 5 :	Melanoma Differentiation-Associated Protein 5
MERS-CoV :	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
MiARN :	Micros Acides Ribonucléiques
MICB :	MHC Class I Chain-Related Protein B
MMF :	Mycophénolate Mofétil
MPro :	Main Protease
MPyV :	Polyomavirus Murin
mTOR :	Mammalian Target Of Rapamycin

N :	Nucléocapside
NAb :	Neutralizing antibody
NCCR :	Non-Coding Control Region
NET :	Neutrophil Extracellular Traps
NK :	Natural Killer
NLS :	Nuclear Localization Signal
NOD :	Nod-Like Receptors
NSP :	Non Structural Proteins
NTD :	N-Terminal Domain
NYS :	Nystatine
OMS :	Organisation mondiale de la Santé
ORF :	Open Reading Frame
PAI1 :	Plasminogen Activator Inhibitor 1
PAMPS :	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBG :	Ponction-Biopsie de Greffon
pCD :	Cellules Dendritiques Plasmacytoïdes
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PIPro :	Papaïne Protease
PML-NB :	Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies
pRb :	Protéine du Rétinoblastome
PRR :	Pattern Recognition Receptor
PTX3 :	Pentraxine 3
pvl :	Polyoma Virus Load
qPCR :	PCR Quantitative
RBD :	Receptor Binding Domain
RBM :	Receptor Binding Motif
RdRP :	Rna-Dependent Rna Polymerase
RIG-I :	Retinoic Acid-Inducible Gene I
RLR :	Rig-I -Like Receptors
RTC :	Replication and Transcription Complex
S :	Spike
S /CO :	Signal to Cut-Off
SARS-CoV :	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus
SARS-CoV-2 :	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
SDRA :	Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë
SIDA :	Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
SRC :	Syndrome de Relargage Cytokinique
STA :	Small T Antigen
SV40 :	Simien Virus 40
TLR :	Toll-Like Receptor
TMPRSS2 :	Transmembrane Serine Protease 2
TNF :	Tumor Necrosis Factor
VIH :	Virus de l'Immunodéficiency Humaine
VLP :	Viral-Like Particule
VOC :	Variants Of Concern

# Introduction

La transplantation rénale est aujourd'hui le traitement de choix de l'insuffisance rénale chronique terminale. Elle offre globalement une meilleure espérance et une meilleure qualité de vie. Néanmoins, les traitements immunosuppresseurs et les comorbidités des patients transplantés rénaux les exposent à des risques infectieux non seulement plus fréquents, mais plus graves aussi. Ce risque est présent tout au long de la transplantation. Actuellement, il est évalué par le clinicien en tenant compte du risque de rejet, de l'intensité de l'immunosuppression et d'autres facteurs qui peuvent contribuer à la sensibilité à l'infection chez le patient transplanté rénal.

En règle générale, les infections surviennent chez 20 à 60 % des transplantés.<sup>1</sup> Il s'agit de la 2<sup>ème</sup> cause de mortalité après les causes cardio-vasculaires.<sup>2</sup> Ces infections peuvent également avoir un impact sur la fonction du greffon rénal. Les infections bactériennes et virales post-transplantation sont de loin les catégories d'infections les plus courantes.

La prévention de ces infections se fait en pré-greffe et en post-greffe notamment par des traitements prophylactiques et les vaccinations spécifiques.<sup>3</sup> Malgré un bénéfice clinique, les patients transplantés rénaux ont également la caractéristique d'avoir une moindre réponse vaccinale et une perte plus rapide de la protection liée au vaccin par rapport aux immunocompétents.<sup>4-6</sup> Cette mauvaise réponse vaccinale s'explique par les comorbidités telles que l'insuffisance rénale chronique et le diabète, mais également l'immunosuppression.<sup>7</sup>

Dans ce travail, nous avons étudié une infection virale opportuniste chronique par le BK polyomavirus (BKPyV) qui peut conduire à la perte du greffon rénal, puis nous avons abordé l'impact d'une infection virale aiguë par le Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) et les résultats de la vaccination anti-SARS-CoV-2 dans cette population.



**Première partie : BK  
polyomavirus en  
transplantation  
rénale**

# I. Revue de la littérature sur le BKPy virus

## A. Historique et découvertes

Le BKPyV est un virus de la famille des *Polyomaviridae*. Le polyomavirus murin (MPyV) est le premier virus mis en évidence de cette famille. Il a été découvert en 1953 par Ludwig Gross.<sup>8,9</sup> La capacité de ce virus à induire des adénocarcinomes de la parathyroïde chez la souris est à l'origine du nom polyomavirus : « poly » signifiant plusieurs et « oma » signifiant tumeur.<sup>10</sup> La découverte du BKPyV a été réalisée environ deux décennies plus tard de façon quasiment concomitante avec un autre polyomavirus humain : le JC polyomavirus (JCPyV).<sup>11</sup> Les noms de ces deux virus correspondent aux initiales des noms des premiers patients chez qui les virus ont été isolés. Le BKPyV a été isolé dans les urines d'un patient transplanté rénal présentant une défaillance rénale dans un contexte de sténose urétérale au sein de l'hôpital St Mary à Londres.<sup>12</sup> Ces urines contenaient des cellules urothéliales avec des inclusions virales. L'observation de ces cellules en microscopie électronique a permis de mettre en évidence des virions similaires au papillomavirus mais leur effet cytopathogène correspondait à celui des polyomavirus.<sup>12</sup>

## B. Classification

Le BKPyV est donc un virus de la famille des *polyomaviridae* et du genre betapolyomavirus. Jusqu'en 2001, les *polyomaviridae* et les *papillomaviridae*, qui partagent de nombreuses caractéristiques structurelles mais ont des organisations génomiques très différentes, étaient classés ensemble dans la famille désormais obsolète des papovaviridae.<sup>13</sup> Aujourd'hui, la famille des *polyomaviridae* comporte au total 6 genres basés sur la séquence codant l'antigène T (Alphapolyomavirus, Betapolyomavirus, Gammapolyomavirus, Deltapolyomavirus, Epsilonpolyomavirus et Zetapolyomavirus) et 112 virus. La majorité de ces virus ont été découverts à partir des années 2000 grâce aux méthodes de séquençage à haut débit. Ils sont le plus souvent spécifiques de leur hôte. Les mammifères, les oiseaux et les

poissons sont les hôtes connus de ces virus.<sup>14</sup> Les principaux polyomavirus humains sont représentés dans la figure 1.

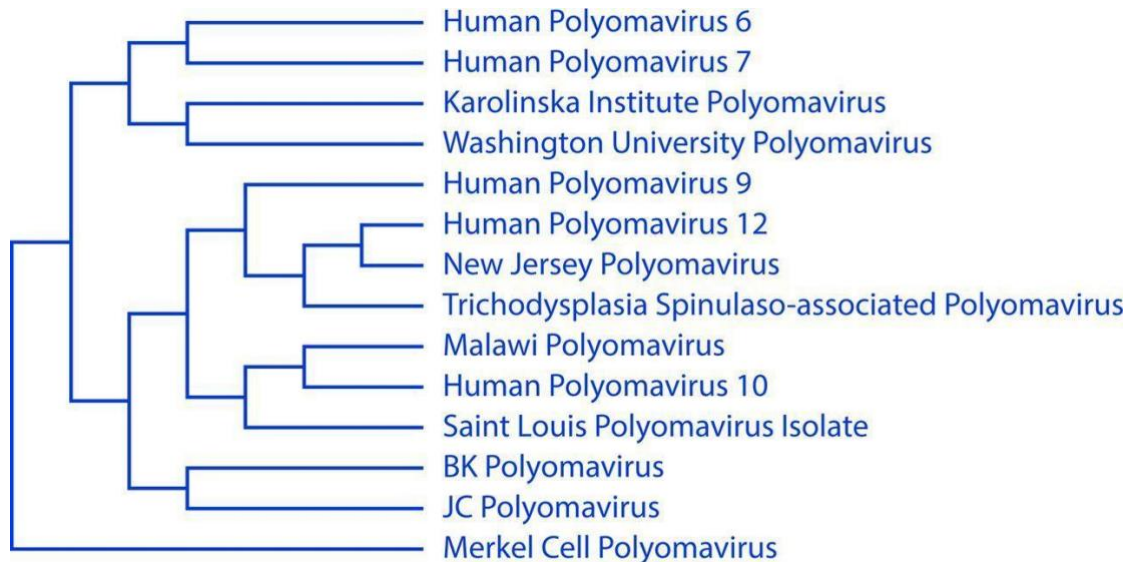


Figure 1. Arbre phylogénétique illustrant les relations entre les polyomavirus humains découverts à ce jour. D'après Ambalathingal *et al.*<sup>15</sup>

## C. Caractéristiques du virus

### 1) Structures du BKPyV

Le BKPyV est un virus nu à acide désoxyribonucléique (ADN). D'un diamètre de 40-45 nm (figure 2), il possède une capsidie icosaédrique de symétrie  $T=7$  composée de 72 capsomères. Chaque capsomère est constitué d'un pentamère de la protéine majoritaire de capsidie VP1, associée sur la face interne à deux protéines minoritaires de capsidie (VP2 et VP3). Ces deux protéines possèdent un point de contact avec les histones et l'ADN du virus.<sup>16</sup> La protéine VP1 est la seule protéine exposée à la partie externe de la capsidie. La capsidie renferme un génome viral constitué d'une molécule d'ADN double brin circulaire de 5,1 kb compactée par les histones cellulaires sous la forme d'un mini-chromosome super enroulé.<sup>17</sup> La figure 3 est une représentation schématique du virus.

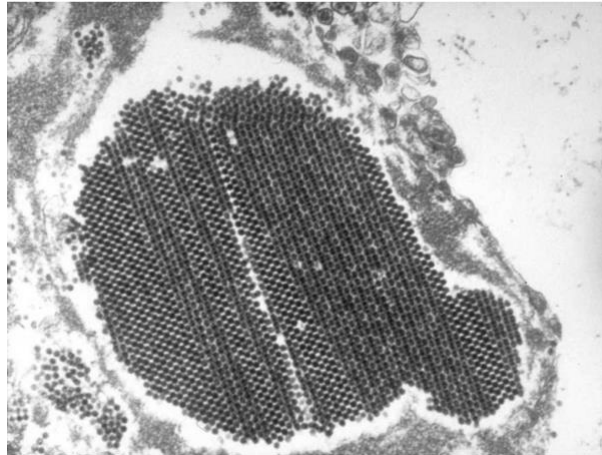


Figure 2. Microscopie électronique montrant des particules de BKPyV

Les particules mesurent entre 45 et 55 nm de diamètre. D'après Wu *et al.*<sup>17</sup>

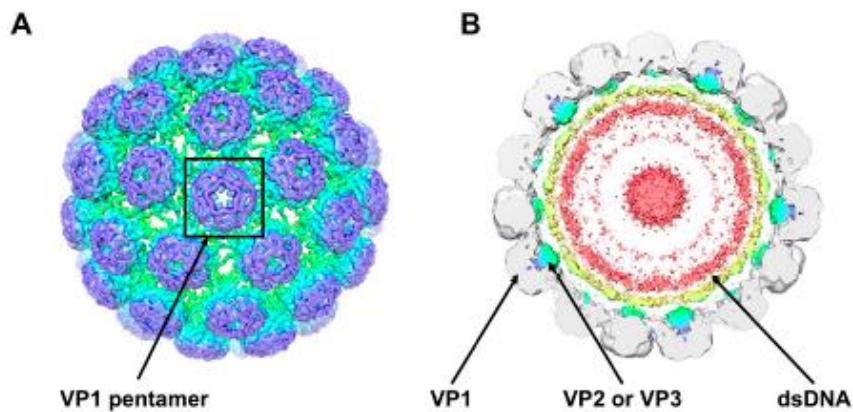


Figure 3. Structure de cryo-électron microscopie du BKPyV.

A, Vue externe avec la protéine VP1 ; B, Vue interne avec les protéines VP1, VP2 et VP3 formant un capsomère ainsi que l'ADN double brin. D'après Helle *et al.*<sup>18</sup>

## 2) *Génome viral*

Les histones de la cellule (H2A, H2B, H3 and H4) permettent d'empaqueter le génome viral.<sup>19</sup>

L'ADN double brin du BKPyV est un ADN circulaire qui est constitué de trois parties :

- La région précoce qui code les protéines de la réplication
  - Antigène grand T (LTA)

- Antigène petit T (STA)
- Antigène T tronqué
- La région tardive qui code :
  - Les protéines structurales de la capsid (VP1, VP2 et VP3)
  - Agnoprotéine
- La région de contrôle non codante (*Non-Coding Control Region, NCCR*)

La région NCCR, constituée d'approximativement 400 paires de bases, est composée de 5 blocs : O, P, Q, R, S. Elle contient en son centre l'origine de réplication du génome (bloc O) ainsi qu'un promoteur bidirectionnel. La réplication peut donc se faire de manière bidirectionnelle vers la région précoce ou vers la région tardive.<sup>15</sup> Les blocs P, Q, R et S contiennent les séquences promotrices et régulatrices des régions précoce et tardive avec de multiples sites de liaison de facteurs de transcription cellulaires de l'hôte.<sup>20,21</sup> La région NCCR peut être archétype ou réarrangée. Les NCCR archétypes possèdent les blocs O, P, Q, R et S alors que dans les NCCR réarrangées, il existe des délétions et des réplifications de certaines séquences durant la réplication à l'origine de nouveaux mutants.<sup>22</sup> La majorité des réarrangements sont des duplications ou des triplications du bloc P. Des délétions peuvent survenir dans les blocs P, Q, R ou S mais elles concernent plus fréquemment une partie ou la totalité du bloc R. À l'inverse, les blocs P et S sont globalement préservés dans l'ensemble des variants.<sup>23</sup> L'ensemble de ces modifications aboutissent à l'apparition ou la disparition de nouveaux sites de fixation des facteurs de transcription.<sup>24,25</sup>

Les souches de BKPyV isolées chez des sujets immunocompétents possèdent quasi-exclusivement des régions NCCR archétypes alors que les souches de BKPyV avec des NCCR réarrangées sont retrouvées chez l'immunodéprimé dans des situations pathologiques.<sup>26</sup> Dans l'étude de Gosert *et al.*, les NCCR réarrangées étaient plus fréquemment retrouvées dans le

plasma par rapport aux urines et étaient associées à un pic de virémie BKPyV plus important, qui dure plus longtemps et a un effet pathogène plus marqué.<sup>27</sup> De plus, contrairement aux souches réarrangées, on observe que les formes archétypes de BKPyV se répliquent mal en culture cellulaire. L'hypothèse est que les réarrangements de la région NCCR constituent une adaptation du virus nécessaire à une croissance efficace dans divers types de cellules *in vitro*.<sup>23</sup> Ceci suggère que les NCCR réarrangées émergent chez le transplanté rénal et augmentent la réplication virale ainsi que l'effet pathogène du virus. Les modifications de la région NCCR sont à l'origine d'une augmentation de l'expression des gènes de la région précoce et une diminution de l'expression des gènes de la région tardive par rapport au virus portant une région NCCR archétype.<sup>24,27</sup> Le défaut d'immunité T cytotoxique anti-LTA permettrait le développement de BKPyV avec des souches NCCR réarrangées.<sup>27</sup> Ces souches auraient un impact sur le tropisme cellulaire et l'effet oncogène de la souche virale.<sup>28</sup>

Les micro acides ribonucléiques (miARN) sont des ARN non-codants et courts qui ont la capacité de dégrader l'ARN messager ou d'inhiber la traduction de l'ARN messager. Ils ont donc la possibilité de réguler la réplication virale. Le BKPyV possède un pré-miARN BKPyV qui est scindé en deux miARN de 22 nucléotides [le miARN 3p (3p miR-B1) et le miARN 5p (5p miR-B1)], qui sont complémentaires de l'ARNm BKPyV LTA. Ils jouent un rôle dans la limitation de la réplication du BKPyV en contrôlant l'expression des gènes de la région précoce. Ceci permettrait la persistance virale au sein de l'hôte.<sup>29,30</sup>

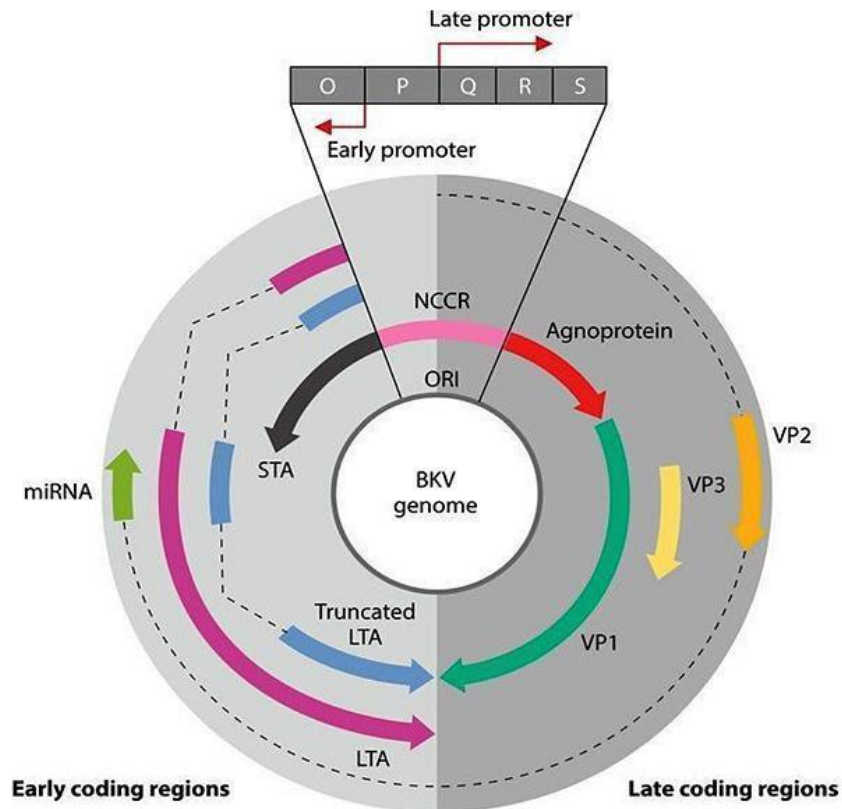


Figure 4. Structure du génome du BKPyV.

La transcription des régions codantes précoces et tardives se déroule de manière bidirectionnelle à partir de l'origine de répllication (ORI) dans la région de contrôle non codante (NCCR). Les régions d'épissage transcriptionnel sont représentées par des lignes pointillées. Les régions codantes précoces codent pour les protéines LTA, STA et l'agnoprotéine. Les régions codantes tardives codent pour les protéines structurales (VP1, VP2 et VP3). L'expression de miARN complémentaires à l'extrémité 3' de LTA s'est avérée impliquée dans le contrôle de la répllication du BKPyV. D'après Ambalathingal *et al.*<sup>15</sup>

### 3) Protéines

Grâce à l'épissage alternatif, le génome de la région précoce permet de produire les protéines LTA, STA et antigène T tronqué. La protéine LTA, d'un poids moléculaire de 80 KDa, possède 695 acides aminés. La protéine STA, d'un poids moléculaire de 20 KDa, possède 172 acides aminés. Les 82 premiers acides aminés sont communs à la protéine LTA. L'antigène T tronqué, d'un poids moléculaire de 17 KDa, possède 136 acides aminés dont les 133 sont communs à la protéine LTA.

La LTA et l'antigène T tronqué possèdent un signal de localisation nucléaire (*nuclear localization signal*, NLS) et sont donc localisés dans le noyau. Ils permettent la réplication virale notamment via l'interaction avec la protéine co-chaperone *Heat Shock cognate 70* (HSC70).<sup>31</sup> Elles favorisent l'entrée et la progression du cycle viral via l'interaction du motif <sup>105</sup>LXCXE<sup>109</sup> avec les gènes suppresseurs de tumeur tel que la protéine du rétinoblastome (pRb). Cette interaction provoque le déplacement des membres de la famille des facteurs de transcription E2F, qui activent ensuite la transcription des gènes impliqués dans la progression de la phase S et la synthèse de l'ADN.<sup>32-34</sup> Contrairement à l'antigène T tronqué, la protéine LTA a une activité ADN hélicase qui est essentielle dans la réplication du génome viral. La protéine LTA reconnaît la séquence GAGGC au niveau de l'origine de réplication et forme des hexamères en présence d'ATP. Les hexamères sont la forme permettant l'activité d'hélicase.<sup>35,36</sup> La protéine STA est présente dans le noyau et le cytoplasme. Elle est impliquée dans la réplication virale et la progression du cycle cellulaire.<sup>37-39</sup>

Le génome de la région tardive code pour les protéines de la capsid et l'agnoprotéine. À partir de l'ADN de la région tardive, un pré-ARN messager est transcrit. Par la suite, par un épissage alternatif, deux ARN messagers sont transcrits : un ARN 16s qui code pour les protéines VP1 et l'agnoprotéine et un ARN 18s qui code pour les protéines VP2 et VP3.<sup>18,40</sup>

La protéine VP1 est constituée de 362 acides aminés, avec un poids moléculaire de 40,7 kDA. Les monomères de VP1 sont formés de feuillets bêta antiparallèles reliés par 4 boucles situées sur la partie externe de la protéine (BC, DE, EF et HI) et d'une boucle située sur la partie interne (GH).<sup>41-43</sup> Ces monomères vont s'assembler afin de former un pentamère grâce à l'interaction entre les boucles (figure 5). La partie N-terminale de la protéine se trouve dans la partie interne du virus et se lie à l'ADN viral<sup>44,45</sup> alors que la partie C-terminale permet le lien entre les différents capsomères afin de former la capsid virale.<sup>34, 35</sup>



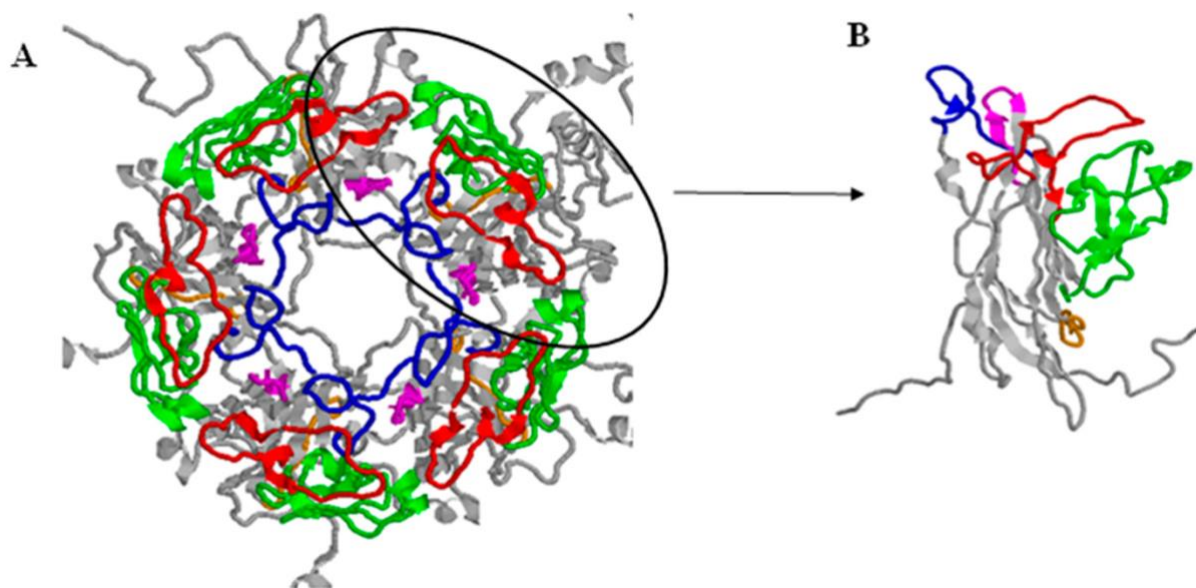


Figure 5. Protéine VP1 du BKPyV.

A, Pentamère de la protéine VP1 ; B, Monomère de VP1. La boucle BC est représentée en rouge, la boucle DE en bleu, la boucle EF en vert, la boucle GH en orange et la boucle HI en magenta. D'après Furmaga J *et al.*<sup>43</sup>

Les protéines VP2 (351 acides aminés ; 38 kDa) et VP3 (232 acides aminés ; 27 kDa) ne sont pas essentielles à l'assemblage et à la stabilité du virion mais elles sont nécessaires à l'infectiosité de la particule virale.<sup>46,47</sup> En effet, la mutation du codon initial de ces protéines réduit l'infectiosité.<sup>48</sup> La partie C-terminale commune aux deux protéines permet la liaison au pentamère de VP1 et possède aussi un site de liaison à l'ADN. Les trois protéines de la capside contiennent une séquence de localisation nucléaire afin d'être importées dans le noyau et VP2 comporte un site putatif de myristoylation dans sa partie N-terminale.

L'agnoprotéine est une protéine non-structurale de 8 kDa et 66 acides aminés. Durant la phase tardive de l'infection virale, elle est essentiellement retrouvée dans le cytoplasme mais une faible proportion est également dans le noyau.<sup>49,50</sup> Cette protéine joue un rôle dans le cycle cellulaire. Une infectiosité diminuée a été observée en l'absence d'agnoprotéine.<sup>50</sup> Cette

protéine pourrait jouer un rôle dans l'assemblage, la maturation et/ou la libération du virus. La délétion de la partie 5' terminale du gène codant pour l'agnogène est à l'origine d'absence de libération des particules virales. Néanmoins, l'infectiosité était rétablie après trans-complémentation du gène de l'agnoprotéine.<sup>51</sup> Elle aurait également un rôle inhibiteur de la sécrétion de cytokines et d'interféron par les cellules infectées, permettant un échappement au système immunitaire.<sup>18</sup> De plus, elle inhibe l'expression des gènes de la région précoce et tardive.<sup>27</sup>

#### **D. Cycle viral**

Les cellules tubulaires rénales et les voies urinaires sont les principaux sites de réplication du BKPyV. Néanmoins, le virus a été détecté dans d'autres types de cellules tels que les leucocytes.<sup>52</sup>

L'infection d'une cellule nécessite l'attachement à la surface cellulaire et une interaction avec un récepteur fonctionnel avant une internalisation. Le site de fixation se trouve entre le feuillet bêta C1 et la boucle BC de la protéine VP1. Les récepteurs du BKPyV appartiennent à la famille des gangliosides. Ce sont des glycosphingolipides présents à la surface de nombreuses populations cellulaires. Ils sont composés d'une chaîne céramide et d'un oligosaccharide présentant un ou plusieurs acides sialiques.<sup>53</sup> Ces acides sialiques sont liés en  $\alpha$  (2,3) ou  $\alpha$  (2,6) à la chaîne saccharidique principale et en  $\alpha$  (2,8) à d'autres acides sialiques internes. Le motif  $\alpha$  (2,8) est nécessaire à la fixation du virus à sa cellule cible.<sup>54</sup> Les gangliosides GD1b et GT1b ont été initialement identifiés comme récepteurs du BKPyV puis d'autres gangliosides ont été identifiés comme GD2 et GD3.<sup>54,55</sup>

L'internalisation se fait par la voie des cavéolines contrairement à d'autres polyomavirus comme le JCPyV qui utilise la voie des clathrines.<sup>56,57</sup> En effet, l'inhibition de la voie des cavéolines par des agents déplétants du cholestérol, le méthyl-bêta-cyclodextrine (MBCD) et

la nystatine (Nys) dans des cellules HRPTEC (*human renal proximal tubular epithelial cells*) a conduit à la baisse de l'infectiosité des cultures cellulaires.<sup>56</sup> Le virus est ensuite transporté vers le réticulum endoplasmique via le système des microtubules.<sup>15</sup> À ce niveau, il est partiellement décapsidé, créant une surface hydrophobe à l'origine de l'exposition des protéines VP2 et VP3. Ces dernières se lient à la membrane du réticulum endoplasmique menant à la libération dans le cytoplasme de la particule virale. Les NLS exprimés au sein de la capsidie mènent le virus vers le noyau. L'entrée dans le noyau se fait grâce aux protéines VP2 et VP3.<sup>41</sup> Les processus de transcription, traduction et réplication du génome viral nécessitent l'implication de la machinerie enzymatique cellulaire. Les régions codantes précoces sont transcrites avant le début de la réplication.<sup>15</sup> Les facteurs de transcription cellulaires agissent sur le promoteur précoce situé dans la région NCCR et favorisent l'expression des protéines LTA et STA. Ces antigènes s'accumulent dans le noyau et aident à la réplication de l'ADN viral. Au cours du processus de réplication de l'ADN viral, la protéine LTA forme un complexe multimérique qui se lie à l'origine de la réplication et agit comme une hélicase pour faciliter la transcription des régions codantes tardives.<sup>35,36</sup> Elle régule également le cycle cellulaire permettant l'entrée en phase S du cycle cellulaire par une action sur des gènes suppresseurs de tumeurs tels que les gènes pRb et p53.<sup>33,34</sup> La protéine STA est impliquée dans la réplication virale et la progression du cycle cellulaire en inhibant l'activité enzymatique de la protéine phosphatase 2A notamment.<sup>18,37-39</sup> Par la suite, les gènes de la région tardive sont transcrits puis leurs ARNm sont traduits en protéines des capsides VP1, VP2, VP3 et l'agnoprotéine dans le noyau. L'association de VP1 avec des protéines chaperonnes de la famille hsp70 dans le cytoplasme permettrait d'empêcher l'assemblage prématuré des virions.<sup>58</sup> Le signal NLS de VP1 permet le transport des complexes VP1-VP2 et VP1-VP3 vers le noyau.<sup>59</sup> À cet endroit, les particules virales se forment. Le mécanisme de libération des virions n'est pas clairement identifié mais il a été suggéré que l'accumulation de particules dans le noyau conduit à la lyse

de la membrane nucléaire et de la cellule.<sup>60</sup> Cependant, une petite fraction des virions peut également être libérée dans l'environnement extracellulaire par sécrétion cellulaire. La figure 6 représente de façon schématique le cycle viral.

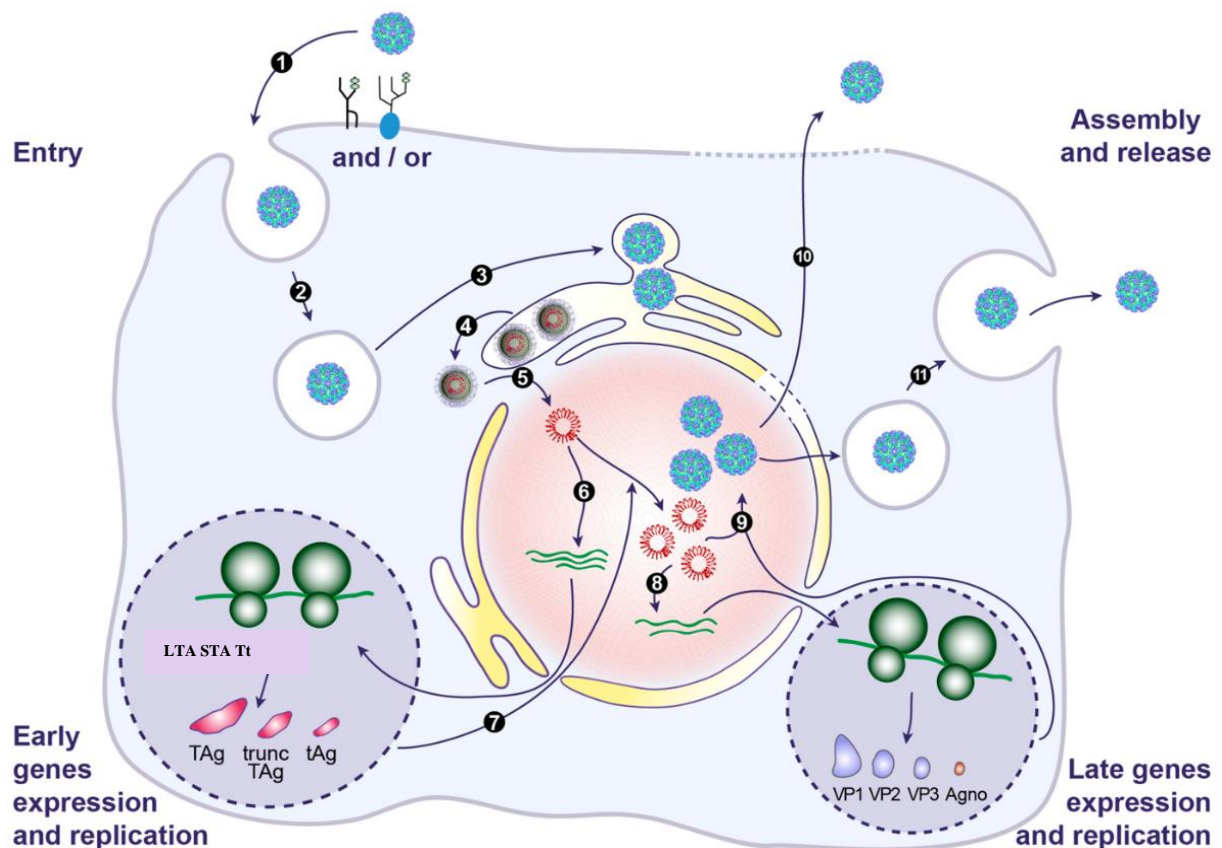


Figure 6. Modèle du cycle de vie du BKPyV.

(1) Liaison des virions aux récepteurs gangliosides (en particulier GT1b et GD1b) ; (2) Internalisation par une endocytose médiée par la cavéole ; (3) Le virus passe ensuite des endosomes tardifs au réticulum endoplasmique ; (4) Décollement partiel de la capsidexposant VP2/VP3 qui se lie et s'intègre dans la membrane du réticulum endoplasmique, conduisant à la libération de virus partiellement non revêtus dans le cytosol ; (5) Transport du génome viral dans le noyau via le complexe de pores nucléaires grâce à un signal NLS dans les protéines VP2/VP3 ; (6) Expression des gènes précoces ; (7) Translocation des protéines LTA, STA et la protéine T tronquée (Tt) dans le noyau où elles servent à initier la réplication de l'ADN viral ; (8) Expression des gènes tardifs ; (9) Transfert de VP1, VP2 et VP3 dans le noyau où ils s'auto-assemblent pour former des capsides dans lesquelles l'ADN viral double brin nouvellement synthétisé est encapsidé ; (10) Libération

des virions après la lyse cellulaire ; (11) Cependant, une petite fraction des virions peut également être libérée dans l'environnement extracellulaire par sécrétion cellulaire. Adapté de Helle *et al.*<sup>18</sup>

### **E. Histoire naturelle de l'infection à BKPyV**

La primo-infection se déroule généralement dans l'enfance. La voie de transmission reste incertaine. L'isolement du BKPyV dans les amygdales et les voies respiratoires d'enfants supposent une infection via les voies respiratoires.<sup>61,62</sup> Une contamination orale par les aliments ou de l'eau contaminée est également possible.<sup>63,64</sup> De façon plus rare, la transmission peut se faire via des transfusions, durant les grossesses par voie transplacentaire ou lors de la transplantation rénale.<sup>52,65-67</sup> Le virus archétype serait la forme transmissible du BKPyV car sa structure NCCR peut donner lieu à tous les réarrangements connus et parce qu'il est isolé à la fois chez des personnes immunocompétentes et des personnes immunodéprimées.<sup>68</sup> Cette primo-infection est souvent asymptomatique mais peut parfois être à l'origine d'une symptomatologie respiratoire. Le passage du virus dans le sang se ferait via les amygdales.<sup>52</sup> Il infecterait les leucocytes puis se disséminerait vers les organes cibles tels que les reins et les voies urinaires.<sup>52</sup> À ce niveau, le virus persiste mais ses mécanismes de persistance ne sont pas encore complètement élucidés. Le virus peut se réactiver de manière asymptomatique chez 5-27 % des personnes immunocompétentes.<sup>69-71</sup> Cette réactivation est détectée par une virurie.

### **F. Épidémiologie**

La séroprévalence du BKPyV peut atteindre 98 % dans l'ensemble de la population.<sup>72</sup> Elle dépend de l'âge. Dans une cohorte de 2222 personnes immunocompétentes du Colorado, la séroprévalence était basse entre 1 et 5 ans (38 %) et atteignait un pic de 87 % entre 21 et 50 ans.<sup>73</sup> Deux autres séries montrent que cette séroprévalence pouvait atteindre un maximum de 91-98 % entre 5 et 9 ans selon les séries (figure 7).<sup>72,74</sup>

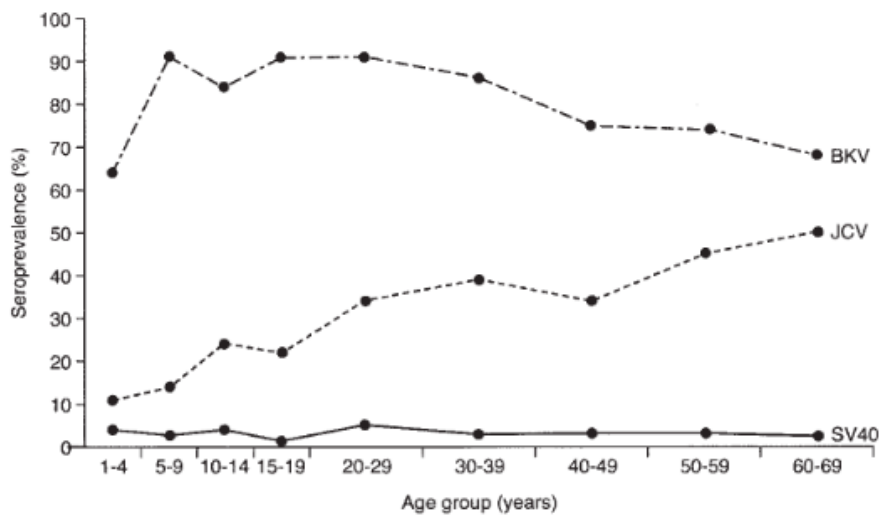


Figure 7. Séroprévalence par groupe d'âge du BKPyV, JCPyV et du virus simien 40 (SV40). Cohorte anglaise de 2435 patients. D'après Knowles *et al.*<sup>74</sup>

### G. Les génotypes et sérotypes BKPyV

Il existe quatre génotypes BKPyV différents numérotés de I à IV. Ces quatre génotypes sont déterminés par le polymorphisme de la séquence de nucléotides 1744–1812 située au niveau de la boucle BC de la protéine de capsid VP1.<sup>75</sup> Cette séquence code les acides aminés 61 à 83 de la partie N-terminale de la protéine VP1 (tableau I). Elle est à l'origine de sérotypes distincts.

Tableau I. Les polymorphismes nucléotidiques et les substitutions d'acides aminés du BKPyV, permettant de classer les différents BKPyV en quatre génotypes.

Les nucléotides non discriminatoires ont été omis pour des raisons de simplicité. D'après Tremolada *et al.*<sup>76</sup>

BKV subtype (viral strain)	Nucleotides at indicated positions <sup>a</sup>										
	1744– 1746	1747	1760	1765– 1767	1768– 1770	1775	1784	1787	1792– 1794	1809	1811
I (DUN)	G.A	A	T	.TA	AAG	G	A	A	AGC	G	G
II (SB)	G.T	A	A	.TA	AAG	C	A	C	GAC	C	A
III (AS)	G.T	A	A	.AG	CAC	G	A	C	GAG	C	G
IV (IV)	A.T	G	A	.TA	AGA	C	C	C	GAG	C	G

BKV subtype (viral strain)	Amino acids at indicated positions										
	61	62	66	68	69	71	74	75	77	82	83
I (DUN)	Glu	Asn	Phe	Leu	Lys	Ser	Asn	Asp	Ser	Glu	Arg
II (SB)	Asp	Asn	Tyr	Leu	Lys	Thr	Asn	Ala	Asp	Asp	Lys
III (AS)	Asp	Asn	Tyr	Gln	His	Ser	Asn	Ala	Glu	Asp	Arg
IV (IV)	Asn	Asp	Tyr	Leu	Arg	Thr	Thr	Ala	Glu	Asp	Arg

À partir des séquençages de VP1 et de la LTA<sub>g</sub>, des sous-groupes pour chaque génotype ont été déterminés.<sup>77</sup> Les génotypes I et IV sont respectivement divisés en quatre (Ia, Ib1, Ib2, Ic) et six (IVa1, IVa2, IVb1, IVb2, IVc1 et IVc2) sous-groupes. La répartition géographique des génotypes et des sous-groupes est différente selon les régions. Alors que le sous-groupe Ia est surtout présent en Afrique, les sous-groupes Ib2 et IVc2 sont retrouvés en Europe. En Asie, de nombreux sous-groupes sont détectés : Ib1, Ic, IVa1, IVa2, IVb2 et IVc1 (figure 8).<sup>78,79</sup> Une co-infection avec de multiples sous-groupes est possible chez des individus sains ou malades.<sup>80</sup>

Malgré les différences géographiques dans la prévalence du sous-type BKPyV, le sous-type Ib est le plus répandu chez 60 % à 80 %, suivi du sous-type IVa chez 10 % à 20 % dans des études incluant des donneurs de sang sains et des patients transplantés rénaux.<sup>69,81</sup>

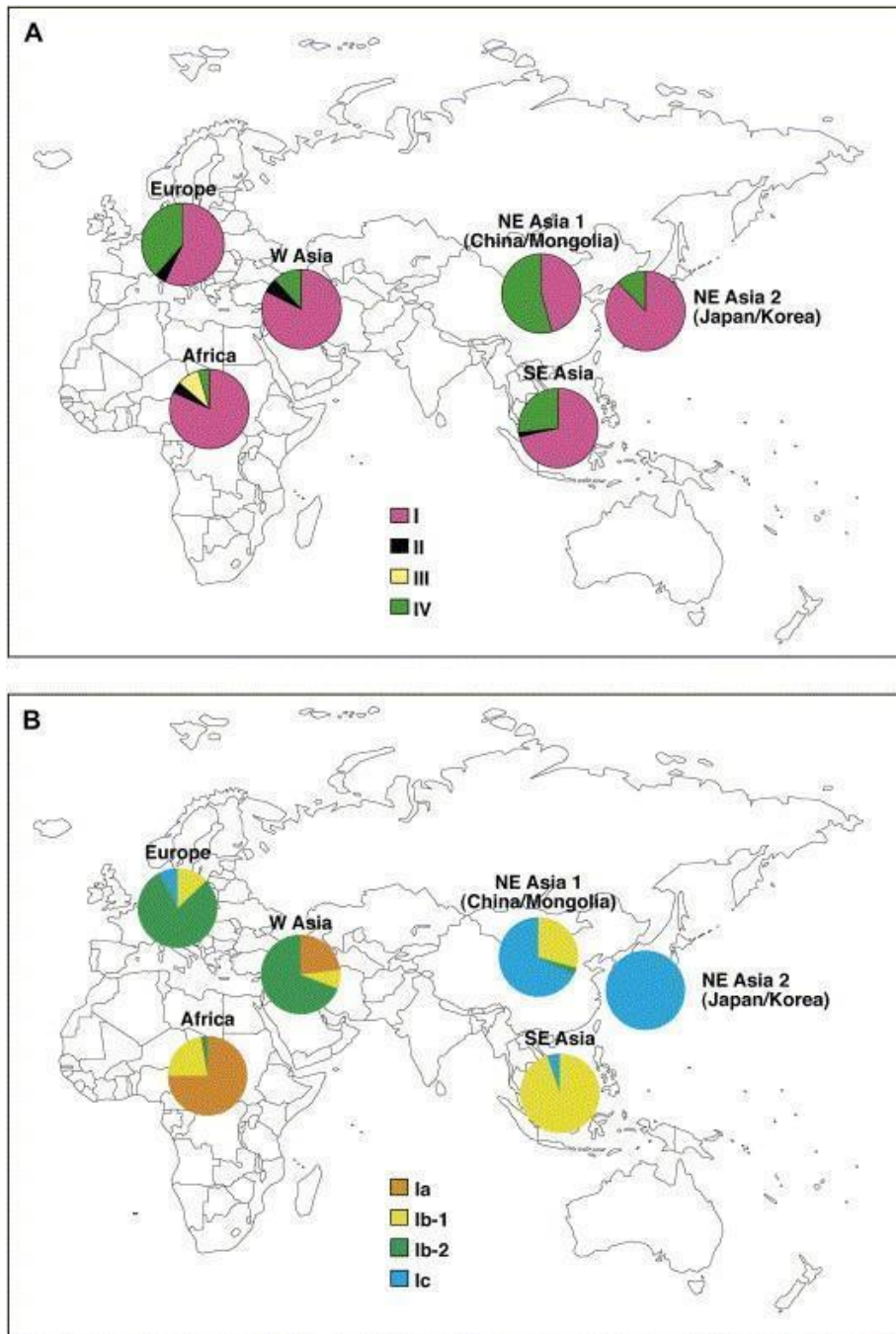


Figure 8. Répartition des géotypes de BKPyV et des sous-groupes de sous-type I dans les principales zones géographiques.

Les fréquences des géotypes BKPyV (A) et les sous-groupes du géotype I (B) sont représentés par des couleurs différentes dans les camemberts. D'après Zheng *et al.*<sup>81</sup>



Des études *in vitro* ont montré que les différents sérotypes peuvent se lier aux cellules par des voies moléculaires différentes et ont un tropisme cellulaire spécifique. Le génotype IV a la possibilité d'infecter des lignées cellulaires via une voie indépendante des gangliosides contrairement aux autres génotypes.<sup>82</sup> La capacité de réplication dans des cultures cellulaires est également différente selon le génotype.<sup>76</sup> À ce jour, l'impact du génotype et du sous-type sur la pathogénie est débattu. Chez les transplantés rénaux, les charges virales urinaires étaient plus élevées chez les personnes infectées par le génotype Ia par rapport au génotype Ib.<sup>83</sup> Une autre étude a révélé que l'infection par le génotype IV du BKPyV peut être liée à un risque plus élevé de néphropathie à BKPyV.<sup>84</sup> Enfin, une infection par deux génotypes, notamment les génotypes I et II, était associée à un début précoce de la réplication virale, à une charge virale plus élevée et à un risque accru de néphropathie à BKPyV dans une étude rétrospective récente.<sup>85</sup> À l'inverse, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre le génotype et le caractère pathogène du virus dans d'autres études.<sup>86</sup>

## **H. Réponse immunitaire anti-BKPyV**

La figure 9 illustre la réaction immunitaire innée et adaptative chez le sujet immunocompétent et le sujet immunodéprimé.

### ***1) Réponse immunitaire innée anti-BKPyV***

La réponse immunitaire innée est essentielle dans la défense antivirale. Vis-à-vis du BKPyV, les défensines et les cytokines jouent un rôle dans l'immunité anti-BKPyV. Les défensines sont de petits peptides qui forment des liaisons disulfures intramoléculaires. Ces peptides excrétés inhibent l'infection par des virus enveloppés et non-enveloppés. La 5- $\alpha$ -défensine humaine provoque l'agrégation des particules virales BKPyV et empêche l'attachement aux cellules, permettant ainsi d'inhiber l'infection virale.<sup>87</sup> Ce peptide est retrouvé dans les voies urinaires, site préférentiel de réplication du BKPyV. De plus, l'interferon- $\gamma$  inhibe le BKPyV en

empêchant la transcription virale.<sup>88</sup> Néanmoins, des analyses à partir de puces à ADN des cellules HRPTEC infectées par le BKPyV ont montré une absence d'induction de l'expression de cytokines suggérant un mécanisme d'échappement du virus ou de son interaction avec les acteurs de l'immunité innée.<sup>89</sup>

Les récepteurs KIR (*killer-cell immunoglobulin-like receptors*) des cellules « *natural killer* » ou NK jouent également un rôle dans l'immunité innée anti-BKPyV. Ces récepteurs ont soit la capacité d'activer ou d'inhiber l'activité des cellules NK. Les patients transplantés avec une néphropathie à BKPyV auraient un nombre moins important de récepteurs KIR activateurs, notamment les récepteurs KIR3DS1 par rapport à un groupe contrôle de patients transplantés. Cette étude suggère les effets protecteurs de l'activation des récepteurs KIR dans l'infection par le BKPyV et suggère une prédisposition génétique liée aux cellules NK au développement de la néphropathie associée au BKPyV.<sup>90</sup>

Une étude a montré qu'un taux faible de cellules dendritiques circulantes en pré-transplantation et post-transplantation était un facteur de risque de développer une virémie BKPyV après la transplantation. Les cellules dendritiques permettent l'activation des lymphocytes T via leur rôle de cellules présentatrices d'antigènes.<sup>91</sup> À partir de modèles murins de néphropathie à BKPyV, Drake *et al.* ont montré que le nombre de cellules dendritiques était corrélé à la réponse lymphocytaire T CD8+ anti-BKPyV. Une autre étude a montré une augmentation des cellules dendritiques myéloïdes dans les biopsies de néphropathie à BKPyV par rapport aux biopsies de rejets médiés par les lymphocytes T. Ces cellules étaient essentiellement localisées dans des zones de cellules tubulaires épithéliales infectées par le BKPyV. Le déficit en cellules dendritiques du sang périphérique dans la néphropathie à BKPyV pourrait s'expliquer par la migration de ces types de cellules vers le tissu rénal lésé ou infecté.<sup>92</sup> L'activation des cellules

dendritiques jouerait un rôle important dans l'immunité anti-BKPyV mais le mécanisme de leur activation n'est pas élucidé.<sup>93,94</sup>

D'un autre côté, l'immunité innée joue probablement un rôle dans la perte des greffons rénaux avec une néphropathie à BKPyV. La néphropathie à BKPyV est associée à une inflammation rénale en partie liée à une activation importante de l'immunité innée par l'expression accrue de cytokines et chémokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-6 ou l'interleukine-8 via l'activation du *toll like receptor 3* (TLR3).<sup>95</sup> Cette immunité activerait deux gènes pro-inflammatoires, codant pour la pentraxine 3 (PTX3) et la molécule liée au CMH de classe I (*MHC class I polypeptide-related sequence B*, MICB) lors de l'infection par le BKPyV dans les cellules tubulaires proximales du rein.<sup>89</sup> La PTX3 est une protéine inductible par les cytokines impliquées dans l'immunité innée et l'inflammation. La MICB est une protéine qui régule la réponse immunitaire innée en interagissant avec le récepteur NKG2D sur les cellules NK et les lymphocytes T cytotoxiques.<sup>89</sup>

Le BKPyV possède également plusieurs mécanismes d'échappement au système immunitaire inné. Les corps nucléaires de la protéine de leucémie promyélocytaire (*promyelocytic leukemia nuclear bodies*, PML-NB) sont des structures nucléaires possédant des effets antiviraux contre les virus à ADN et à ARN. En provoquant la séparation de deux des principaux composants protéiques présents de manière constitutive dans les PML-NB, Daxx et SP100, le BKPyV empêcherait l'action des PML-NB.<sup>96</sup> Récemment, une étude s'est intéressée au rôle de l'agnoprotéine dans l'échappement immunitaire qui agirait d'au moins trois manières complémentaires : (1) elle inactiverait la détection immunitaire et les effets inhibiteurs de l'interféron- $\beta$  par la rupture du potentiel membranaire mitochondrial ; (2) elle accentuerait la synthèse des protéines virales via un flux autophagique accru, (3) elle faciliterait la libération des virions du noyau en fragmentant le réseau mitochondrial entourant le noyau.<sup>97</sup>

Un autre mécanisme d'échappement au système immunitaire passerait par les miRNAs codés par le virus. Ces miRNAs reconnaissent le ligand ULBP3. Il s'agit d'un ligand excrété dans un contexte de stress qui est reconnu par les cellules NK via leur récepteur NKG2D. Les miRNAs empêchent donc l'action des cellules NK sur les cellules infectées.<sup>98</sup>

## 2) *Réponse immunitaire adaptative*

### (a) **Réponse immunitaire cellulaire**

L'immunité cellulaire T joue un rôle majeur dans le contrôle de l'infection à BKPyV. Chez l'immunocompétent, le taux de cellules T CD4+ spécifiques du BKPyV productrices d'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) était inversement corrélé à l'âge.<sup>99</sup> En pré-transplantation, aucune association significative entre les réponses des lymphocytes T CD4+ et la survenue de virémie BKPyV en post-greffe n'a été retrouvée. Une des limitations est probablement la faible fréquence des cellules T spécifiques de BKPyV parmi les PBMC (de 10 à 100 fois inférieure à celle observée pour les cellules T spécifiques du cytomegalovirus ou du virus d'Epstein-Barr par exemple).<sup>100</sup> En post-transplantation, la réponse immunitaire T a été associée à un meilleur contrôle de la virurie et de la virémie BKPyV.<sup>101-105</sup> Son efficacité est dépendante des lymphocytes T polyfonctionnels.<sup>106</sup> Elle est dirigée contre les trois protéines de la capsid (VP1, VP2 et VP3) mais aussi contre les deux protéines LTA et STA que ce soit chez l'immunocompétent ou l'immunodéprimé.<sup>107-110</sup> Peu de lymphocytes T sont dirigés contre l'agnoprotéine<sup>111</sup> alors que les lymphocytes T spécifiques de VP1 et de la LTA sont prédominants.<sup>112,113</sup> Selon un modèle mathématique, les réponses des lymphocytes T aux protéines structurelles de la capsid bloqueraient la propagation du virus, tandis que les réponses aux protéines de régulation induiraient la mort des cellules infectées.<sup>114</sup>

L'immunité T anti-BKPyV repose essentiellement sur les CD4+ même si une réponse CD8+ est également détectée.<sup>109,110,115</sup> Les lymphocytes T CD8+ sont essentiellement dirigés contre

la protéine LTA alors que les lymphocytes CD4+ le sont contre la protéine VP1.<sup>104</sup> Ces derniers stimuleraient la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IFN $\gamma$  et le facteur de nécrose tumorale TNF $\alpha$ , ainsi que la molécule cytotoxique granzyme B.<sup>116</sup> La fréquence des lymphocytes T CD4+ *helper* augmente significativement avant et après la phase de clairance, tandis que la fréquence des lymphocytes CD4+ cytolytiques augmente pendant la phase de clairance.<sup>117</sup> Les lymphocytes T CD8+ sont les principaux effecteurs cytolytiques capables de tuer les cellules infectées porteuses d'antigènes des leucocytes humains (*human leukocyte antigen*, HLA) de classe I. De nombreuses études ont essayé de déterminer les épitopes BKPyV restreints à certains HLA mais le faible taux de lymphocytes T CD8+ spécifiques au BKPyV rend cette démarche difficile. Plus récemment, Cioni et ses collègues ont utilisé des méthodes de bio-informatique associées à une stratégie d'expansion *in vitro* pour prédire les épitopes 9-mer issus de la région des gènes précoces du BKPyV. Ces épitopes ont été spécifiquement cartographiés pour les 14 allèles HLA de classe I les plus courants en Europe et en Amérique du Nord. Leurs données montrent que ces épitopes sont conservés et certains ont une forte homologie avec le JCPyV. Cela indique que certaines cellules T spécifiques de BKPyV pourraient fournir une immunité croisée avec le JCPyV.<sup>118</sup>

D'autres données montrent que l'immunité T est spécifique des génotypes BKPyV. Ceci est à l'origine de possibles infections multiples par différents génotypes chez un même individu. L'équipe de Hirsch a récemment étudié l'effet de la substitution d'acides aminés dans des clusters d'épitopes 9-mer immunodominants dans la protéine LTA. Bien que cette protéine soit hautement conservée, des échanges d'acides aminés (qu'ils soient à l'origine de modifications du génotype ou non) se produisent dans ces épitopes immunodominants, réduisent la capacité de liaison des HLA-A et HLA-B aux récepteurs T CD8+ et pourraient donc avoir un effet sur l'efficacité des lymphocytes T CD8+.<sup>119</sup>

Dans certaines situations, la réponse immunitaire T pourrait être délétère. Dans une cohorte de 15 patients transplantés rénaux atteints d'une néphropathie à BKPyV, l'analyse des lymphocytes T CD4+ et CD8+ circulants a montré que la présence de lymphocytes T CD8+ spécifiques du BKPyV dans le sang périphérique peut représenter un risque de perte du greffon rénal. En effet, les deux patients avec des lymphocytes T CD8+ spécifiques détectables dans le sang ont perdu leur greffon.<sup>103</sup> L'ampleur de l'immunité des lymphocytes T spécifiques au BKPyV et de l'inflammation tissulaire peut déterminer l'évolution clinique de l'infection par le BKPyV. Les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques du BKPyV sont nécessaires pour contrôler la réactivation virale. Une clairance virale à un stade précoce permet de contenir l'inflammation du greffon et de prévenir la néphropathie à BKPyV. Cependant, lorsque la réponse des lymphocytes T cytotoxiques n'est pas en mesure de permettre la clairance virale, la réplication à long terme du BKPyV provoque une inflammation majeure. Les cellules T activées continuent alors à migrer dans la zone inflammatoire et, plutôt que de contrôler la réplication virale, elles attaquent les cellules du greffon qui présentent respectivement les antigènes du BKPyV ou du donneur. Ces lésions tissulaires aggravent l'inflammation au sein du greffon, ce qui accélère la prolifération du BKPyV et attire d'autres lymphocytes T cytotoxiques activés, aboutissant finalement à la néphropathie à BKPyV.<sup>120</sup> De façon intéressante, l'équipe de Zeng *et al.* a analysé les récepteurs des lymphocytes T à l'aide d'un séquençage haut débit. Elle a révélé la présence de lymphocytes T spécifiques du virus dans des échantillons de biopsie de patients atteints de virémie ou de néphropathie à BKPyV mais surtout 7 à 8 fois plus de clones de lymphocytes T alloréactifs par rapport aux lymphocytes T spécifiques du virus. Ces observations suggèrent que la lésion tissulaire au cours de la néphropathie à BKPyV est principalement médiée par l'afflux des lymphocytes T déclenché à la fois par l'immunité alloréactive et l'immunité spécifique au virus.<sup>121</sup>

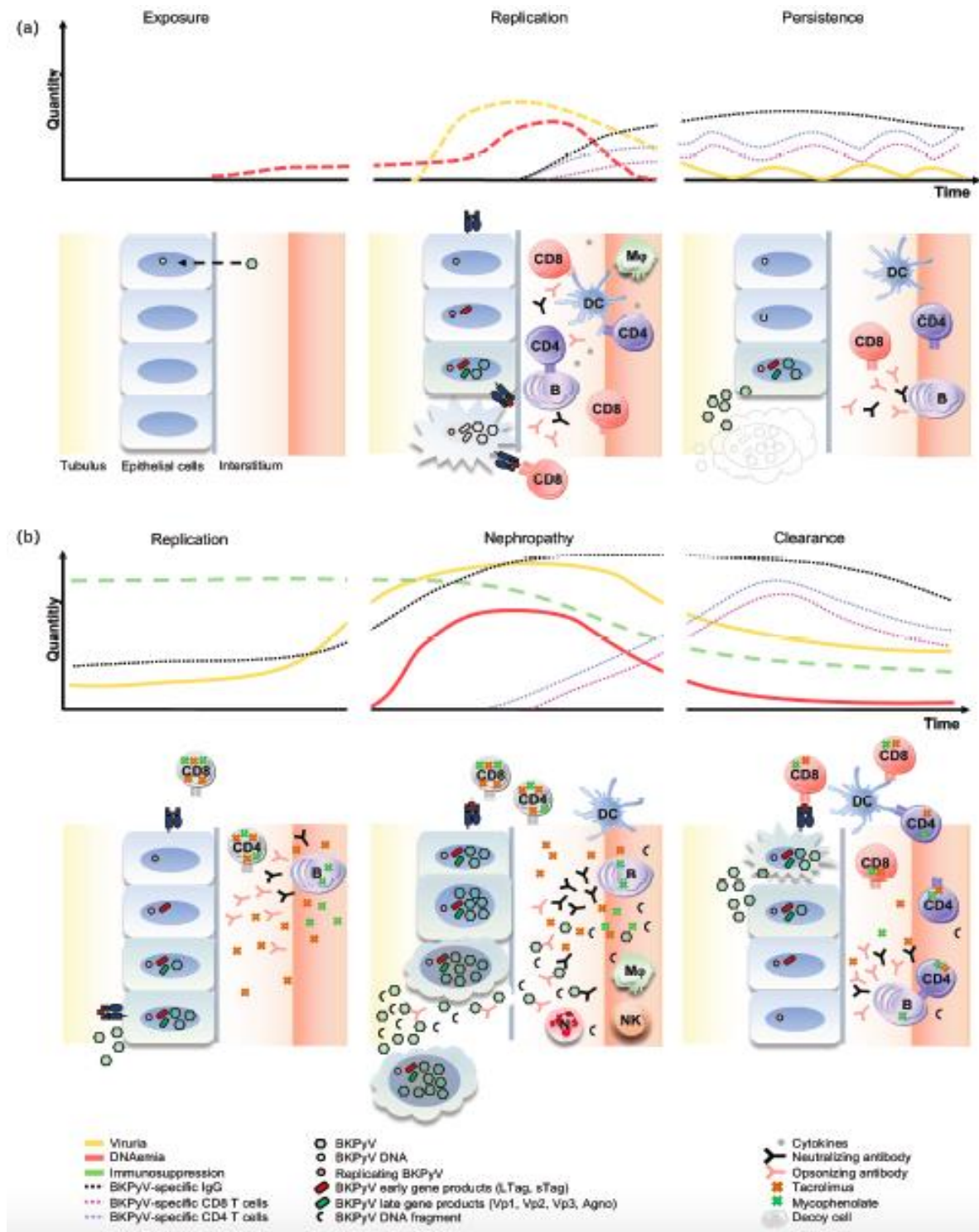


Figure 9. Réactivation BKPyV chez l'immunocompétent (a) et l'immunodéprimé (b) et réaction immunitaire.

Les graphes illustrent les cinétiques de virurie, virémie, d'anticorps et de lymphocytes T. Les schémas illustrent la réplication et la réaction immunitaire au niveau du tubule rénal. B, lymphocyte B ; DC, cellule dendritique ; MF, macrophage ; N, neutrophile ; NK, Natural killer. Lignes pointillées, niveaux extrapolés, lignes continues, niveaux documentés. D'après Kaur *et al.*<sup>122</sup>

## (b) Réponse immunitaire humorale

Comme la majorité des primo-infections BKPyV surviennent dans l'enfance, le taux de séroconversion dans la population est élevé. Des niveaux élevés d'anticorps sont corrélés à une activité plus élevée des lymphocytes T CD4+ spécifiques au BKPyV.<sup>99</sup> Cette immunité est dirigée essentiellement contre des épitopes conformationnels de VP1 et dans une moindre mesure contre la protéine LTA.<sup>123</sup> La cible de ces anticorps neutralisants ou ospsonisants est essentiellement la surface externe des virions.

Chez la population des enfants transplantés rénaux, dans laquelle le taux de séroprévalence du BKPyV est moindre que chez les adultes, les patients séronégatifs étaient à plus haut risque de développer une réplication du virus.<sup>124,125</sup> Mais l'immunité humorale, tout comme l'immunité cellulaire, est spécifique du génotype. Une étude de Pastrana *et al.* a montré que les sérums de donneurs sains ayant des anticorps neutralisants anti-génotype I n'avaient pas ou peu d'activité neutralisante contre les génotypes II et IV. Il est donc important dans une population avec une séroprévalence élevée d'étudier cette immunité pour chaque génotype de façon spécifique. Chez les adultes transplantés rénaux, un titre d'anticorps déterminé par méthodes ELISA à partir de VLP (*viral-like particule*) ou d'anticorps neutralisant (*neutrlazing antibodies*, NAb) était prédicteur d'une virurie et d'une virémie BKPyV.<sup>82,126-130</sup> Un titre élevé d'anticorps du donneur et/ou un titre bas d'anticorps du receveur étaient associés à un risque accru de réplication du virus.

Durant le suivi en transplantation, le titre des anticorps reste stable chez les patients non-réplicatifs alors qu'il augmente chez les patients présentant une virurie associée ou non à une virémie.<sup>126,128,131</sup> La réponse en anticorps était corrélée à l'intensité de l'infection. Les titres d'anticorps BKPyV ont atteint des niveaux plus élevés chez les receveurs virémiques par rapport aux patients viruriques non virémiques, et les niveaux d'anticorps les plus élevés ont été



observés chez les receveurs présentant une virémie soutenue.<sup>126</sup> La cinétique des réponses des anticorps neutralisants différait d'un individu à l'autre. En effet, les patients développant une néphropathie avaient une augmentation plus lente des titres des NAb spécifiques au génotype du BKPyV (figure 10). De façon intéressante, il a été observé une augmentation des titres d'anticorps dirigés spécifiquement contre la souche répliquante mais aussi contre les autres génotypes.<sup>128</sup> L'explication possible pourrait être que la réplication élevée du BKPyV stimule une gamme plus large de lymphocytes B mémoires existants capables de neutraliser différents génotypes de BKPyV et qui deviennent des plasmocytes sécréteurs d'anticorps, comme observé pour d'autres virus.<sup>132</sup>

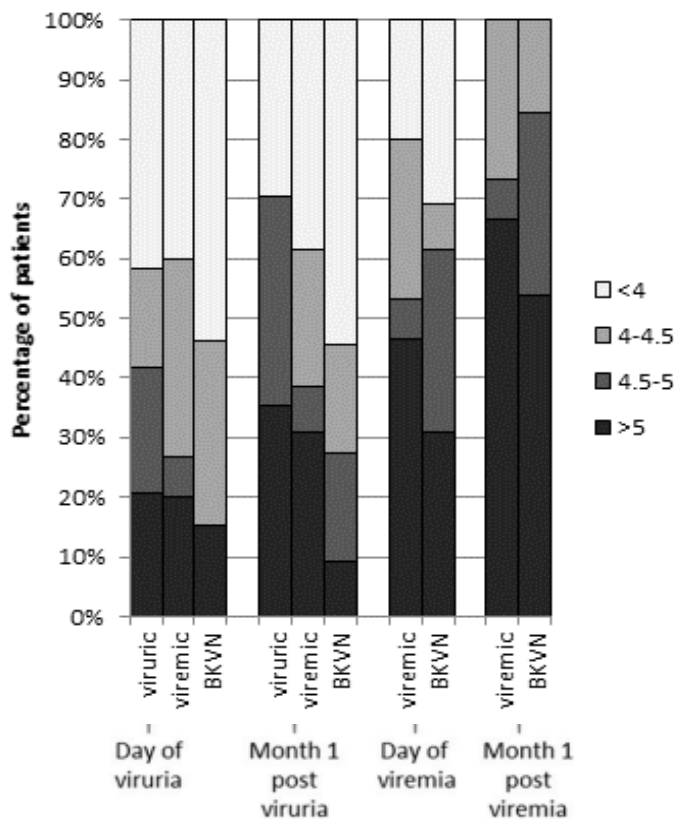


Figure 10. L'évolution des titres NAb dirigés contre la souche de réplication chez les patients viruriques, virémiques et ceux avec une néphropathie à BKPyV.

Une réponse NAb retardée et faible est associée à une infection plus grave par le BKPyV. La distribution des titres des NAb est représentée par des barres colorées. D'après Solis *et al.*<sup>128</sup>

## I. Principales pathologies liées au BKPyV

### 1) *La néphropathie à BKPyV*

#### (a) Pathogénie

La néphropathie à BKPyV est une néphropathie tubulo-interstitielle chronique. Elle touche essentiellement les patients transplantés rénaux. Selon un modèle mathématique, la réplication du BKPyV est initiée dans les cellules épithéliales tubulaires rénales. Elle se dissémine vers les cellules urothéliales où elle s'amplifie. Par la suite, un reflux urétéral provoquerait de multiples sites d'infection dans le greffon. Ceci accélère progressivement la réplication intra-rénale jusqu'à ce qu'un état stable dynamique soit atteint dans les 2 mois.<sup>133</sup> Plus de 90 % de la charge virale urinaire en BKPyV résulterait de la réplication urothéliale locale. La réplication du BKPyV dans les cellules épithéliales tubulaires contribuerait pour moins de 5 % à la charge totale dans l'urine, bien que la grande majorité du BKPyV intra-rénal semble être directement libérée dans l'urine. La charge plasmatique de BKPyV proviendrait de la réplication intra-rénale mais représenterait moins de 2 % de la réplication des cellules épithéliales tubulaires. Celle-ci contribue au moins à une fraction mineure aux charges urinaires de BKPyV via la filtration glomérulaire.<sup>133</sup> Cette charge virale sanguine serait essentiellement constituée de fragments de génome non encapsidés.<sup>134</sup> Les réplifications du BKPyV dans les cellules épithéliales urothéliales et tubulaires doivent être considérées comme indépendantes, vraisemblablement régies par la dynamique locale de l'infection des cellules hôtes. En effet, les cinétiques de charge virale dans le plasma et l'urine étaient totalement discordantes.<sup>133</sup> De plus, des études moléculaires ont détecté différents variants génomiques de la région NCCR en tant qu'espèces majoritaires virales répliquantes dans des échantillons de plasma et d'urine appariés.<sup>27</sup>

La réplication du BKPyV dans les cellules épithéliales tubulaires rénales entraîne une lyse cellulaire. Cette lyse concernerait entre 1 à 10 millions de cellules tubulaires par jour. Les mécanismes de régénération de cette monocouche sont alors dépassés et conduisent à une

dénudation de la monocouche épithéliale dans le tubule. Ceci est suivi par une propagation de virus dans les tissus et la circulation sanguine, des infiltrats inflammatoires dans l'interstitium, une tubulite et un dépassement de la capacité de régénération des cellules épithéliales tubulaires entraînant une atrophie tubulaire et une fibrose interstitielle. Aujourd'hui, il est difficile de distinguer l'origine des dommages causés au greffon (figure 11).<sup>133</sup> L'inflammation et la fibrose ne peuvent pas être facilement attribuées au virus ou à l'immunité antivirale ou anti-donneur. En revanche, les multicouches de cellules urothéliales restent largement intactes chez les patients transplantés rénaux malgré des charges virales urinaires élevées et donc sans dénudation, inflammation et signes cliniques concomitants.

La réactivation du virus est très fréquente chez le transplanté rénal. Celle-ci s'exprime initialement par une virurie ou la présence de « decoy cells » dans 23 à 73 % des patients. Cette virurie peut évoluer vers une virémie dans 8 % à 62 % des cas et enfin vers une néphropathie à BKPyV dans 1 à 10 % des cas.<sup>136-141</sup> La majorité des réplifications BKPyV débutent lors des 6 premiers mois de la transplantation même si elles peuvent survenir de façon tardive en cas de majoration de l'immunosuppression.<sup>141</sup>

Des cas de néphropathie à BKPyV touchant les reins natifs sont également décrits dans des populations de transplantés non-rénaux et d'immunodéprimés.<sup>142-144</sup> Ces cas restent rares, potentiellement pour plusieurs raisons : primo la souche BKPyV provient majoritairement du donneur via le rein et les voies urinaires porteurs du virus, secundo la transplantation est à l'origine de lésions inflammatoires liées à la chirurgie et aux phénomènes d'ischémies-reperfusions qui favorisent la réplication du virus, tertio cette pathologie est probablement sous-diagnostiquée et non recherchée de façon systématique.<sup>144</sup>

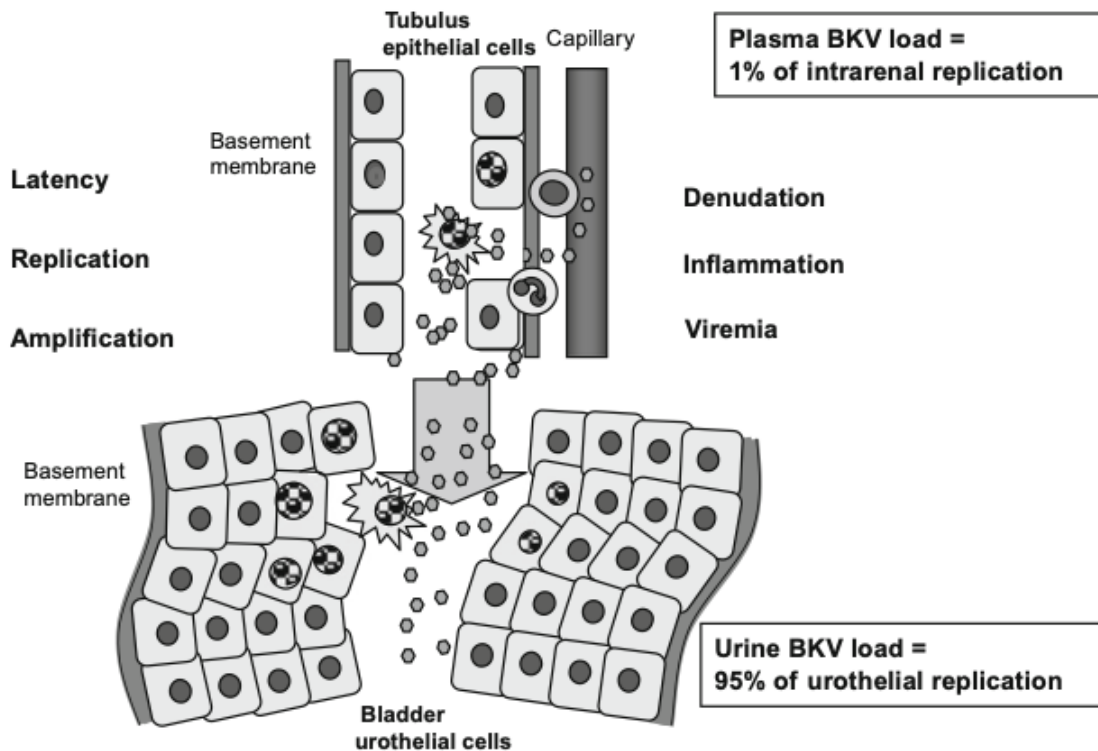


Figure 11. Réplication BKPyV au niveau des cellules épithéliales tubulaires et l'urothélium vésical. D'après Hirsch *et al.*<sup>135</sup>

**(b) Les facteurs de risque de virémie BKPyV et de néphropathie à BKPyV**

Il existe de multiples facteurs de risque de virémie et de néphropathie à BKPyV. Ils peuvent être attribués au donneur, au receveur, au greffon rénal et à l'immunosuppression. Les principaux facteurs de risque sont listés dans la figure 12. L'âge du receveur<sup>145</sup>, le sexe masculin<sup>145</sup>, la durée du diabète<sup>146</sup>, un antécédent de transplantation rénale,<sup>145</sup> ou d'hémodialyse et la durée de la dialyse<sup>147,148</sup> sont des facteurs de risque liés au receveur. Les donneurs décédés et âgés exposent également à un risque plus élevé de réactivation du virus.<sup>145</sup>

L'utilisation de sondes urétrales représente un risque de développer une virémie BKPyV et de néphropathie à BKPyV.<sup>149-151</sup> Ce risque de réactivation augmente avec la durée de maintien des sondes.<sup>151</sup> Les lésions des cellules tubulaires et urothéliales provoquées par cette dernière chez

un hôte immunodéprimé conduiraient à la réplication du BKPyV. Un temps d'ischémie froide prolongé est également un facteur de risque.<sup>152</sup>

### Facteurs de risque réactivation BKPyV

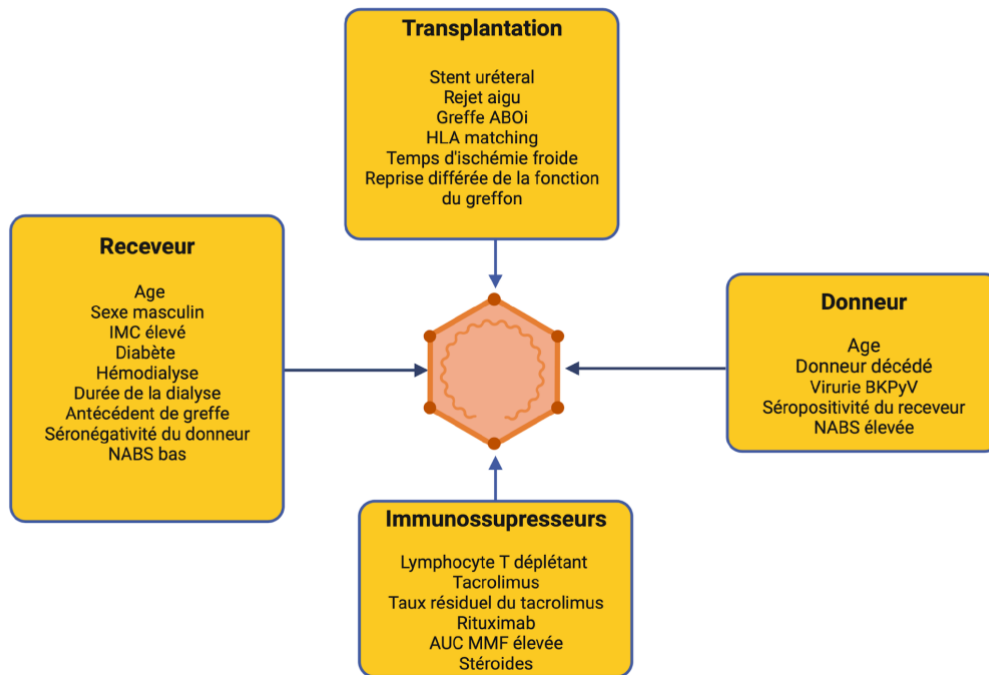


Figure 12. Facteurs de risque de réactivation BKPyV chez le transplanté rénal.

Les transplantations ABO-incompatibles augmentent le risque de réplication du virus. Cette association s'explique en partie par une forte immunosuppression avec notamment le protocole de désensibilisation. En effet, ces traitements exposent à un sur-risque d'infection à BKPyV. Mais une étude rétrospective comparant des patients ayant bénéficié d'une désensibilisation pour une greffe ABO-incompatible versus une greffe HLA-incompatible retrouve un risque plus accru dans le groupe ABO-incompatible.<sup>153</sup> De plus ce risque est plus important chez les receveurs qui avaient des titres d'anticorps anti-A et anti-B élevés avant le protocole de désensibilisation (titre des isoagglutinines  $\geq 1 : 256$ ).

Dans la littérature, de multiples études ont montré une association entre certains allèles HLA et un effet protecteur vis-à-vis de la réplication BKPyV d'autant plus qu'il y a un matching HLA entre le donneur et le receveur pour ces allèles (HLA-A2, HLA-B44, HLA-B51, HLA-Cw7 et HLA-DR15).<sup>154-156</sup>

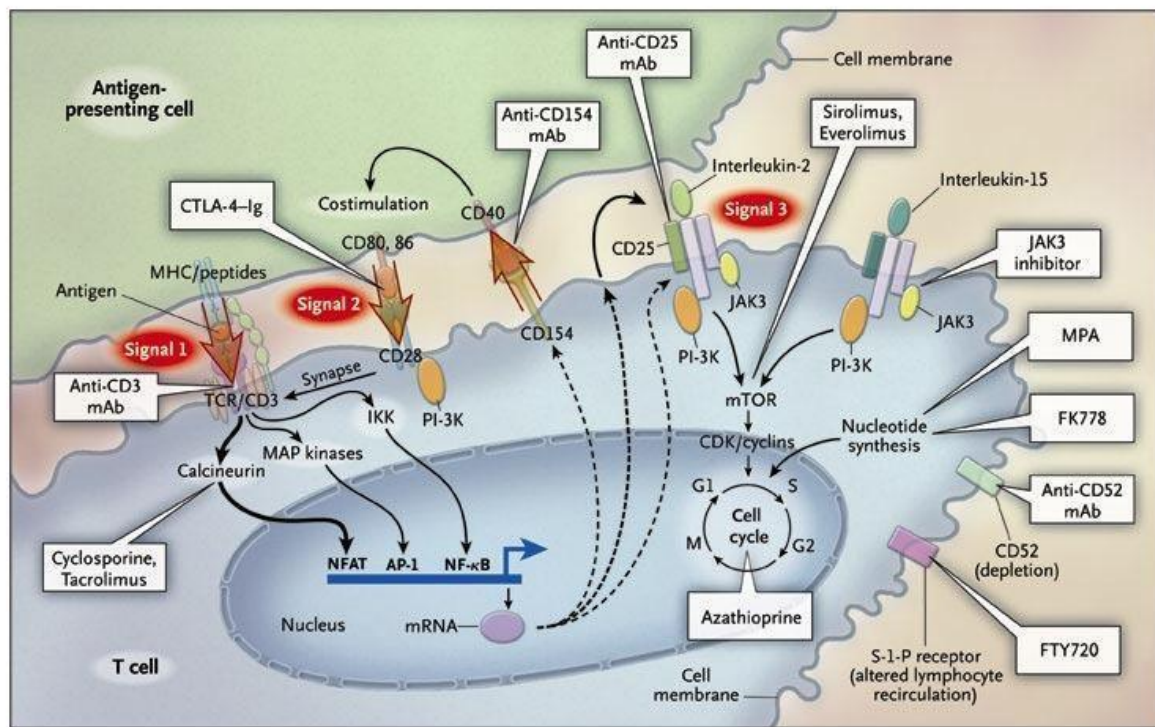


Figure 13. Mécanismes d'action des principaux immunosuppresseurs utilisés en transplantation rénale. Selon Halloran *et al.*<sup>157</sup>

L'immunosuppression constitue un facteur de risque majeur de présenter une réplication du BKPyV. La majorité des traitements immunosuppresseurs utilisés en transplantation agissent sur les lymphocytes T au niveau de la synapse immunologique (l'interface entre une cellule présentatrice d'antigène, ou cellule cible, et un lymphocyte T, figure 13). Dans la majorité des situations, un traitement immunosuppresseur d'induction est mis en place. Il peut s'agir soit d'un traitement T-déplétant (constitué d'anticorps anti-lymphocytes T humains) soit alors d'un traitement non-déplétant (constitué d'anticorps anti-récepteurs de l'interleukine-2 appelés anticorps anti-CD25). Ces derniers agissent au niveau du signal 3 de la synapse immunologique.

Le traitement de maintenance est généralement composé d'un inhibiteur de la voie des anti-calciéurines qui agissent au niveau du 1<sup>er</sup> signal (ciclosporine ou tacrolimus), des antimétabolites (mycophénolate mofétil ou MMF dans la majorité des cas) inhibant l'IMPDH (inosine 5' monophosphate deshydrogénase) +/- associés à des corticoïdes. D'autres traitements immunosuppresseurs peuvent être utilisés tels que les inhibiteurs de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) comme le sirolimus et l'évérolimus ou le bélatacept (molécule qui agit en bloquant le signal de costimulation des lymphocytes T).

Un traitement d'induction par un agent T-déplétant augmente le risque de développer une virémie BKPyV tout comme le rituximab qui est un traitement B-déplétant.<sup>158-160</sup> L'utilisation d'agents T-déplétant et B-déplétant est à l'origine de la baisse de l'immunité anti-BKPyV cellulaire et humorale.<sup>128,161</sup> De la même manière, le tacrolimus est associé à un risque plus accru de réplication du BKPyV par rapport à la ciclosporine.<sup>158,162</sup> A l'inverse, les inhibiteurs de la voie des m-TOR sont associés à une moindre incidence de réplication virale.<sup>158,163,164</sup> Le poids global de l'immunosuppression joue également un rôle primordial. En effet, un taux résiduel de tacrolimus<sup>165,166</sup> et une aire sous la courbe (*area under the curve*, AUC<sub>0-12h</sub>) de MMF élevés sont associés à une majoration du risque de réplication virale.<sup>141</sup>

Les déterminants virologiques chez le donneur et le receveur sont essentiels pour établir le risque de réplication du virus. De plus en plus de données orientent vers une réplication de la souche BKPyV du donneur transmis via le greffon chez le receveur. En effet, le séquençage a révélé un virus identique entre les paires de donneurs et receveurs.<sup>67</sup> De plus, des receveurs d'organe d'un même donneur ont une probabilité plus importante de présenter une réplication du BKPyV.<sup>154</sup> Une virurie BKPyV chez le donneur au moment du don<sup>67,84,167,168</sup> et un titre d'anticorps neutralisants ou non neutralisants élevé chez le donneur<sup>128,131</sup> majorent le risque de réplication du virus. L'intensité de la séroréactivité mesurée du donneur refléterait la quantité

et/ou la virulence du BKPyV infectieux présent dans le greffon rénal infecté de manière persistante. De plus, une séronégativité BKPyV du receveur<sup>167,169</sup> ou un titre d'anticorps neutralisants bas contre la souche du donneur<sup>128</sup> constituent un risque de développer une virémie et une néphropathie à BKPyV. Dans la mesure où chaque génotype BKPyV représente un sérotype distinct<sup>82</sup>, l'analyse de la réponse humorale du receveur devrait être étudiée vis-à-vis de la souche du donneur afin d'évaluer le risque vis-à-vis du BKPyV. Malheureusement aujourd'hui, la majorité des études ne prennent pas en compte ce critère.

## 2) *Cystite hémorragique*

La cystite hémorragique liée au BKPyV est une pathologie qui touche essentiellement les patients greffés de cellules souches hématopoïétiques. Sa définition clinique se base sur trois critères<sup>170</sup> :

- Un tableau clinique de cystite : dysuries, douleurs abdominales, urgenteries et pollakiuries
- Une hématurie macroscopique
- Une virurie BKPyV importante  $> 7 \log_{10}$  copies/mL

L'ensemble des critères diagnostiques doivent être présents. En effet, la réplication BKPyV est fréquente chez les patients ayant bénéficié d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques. Elle est observée chez 50 à 80% des patients.<sup>171-173</sup> De même, les cystites peuvent avoir d'autres étiologies que le BKPyV. Ces étiologies, telles que la réaction du greffon versus l'hôte (GVH) ou les cystites hémorragiques liées à d'autres virus comme l'adénovirus ou le cytomégalovirus<sup>171,172</sup>, doivent être systématiquement recherchées. La cystite hémorragique liée au BKPyV est une pathologie fréquente en greffe de cellules souches hématopoïétiques avec une incidence de 5 à 15 % environ 3 à 6 semaines après la greffe et est associée à une survie globale plus faible.<sup>172,174,175</sup>



Le mécanisme physiopathologique comprend trois étapes principales<sup>176</sup> :

- Le conditionnement pour la greffe surtout par le cyclophosphamide, le busulfan ou l'ifosfamide ou alors l'irradiation corporelle totale sont à l'origine d'une fragilité du tissu urothélial. L'hyperhydratation avec diurèse forcée et un traitement par mesna (administré en association avec du cyclophosphamide ou de l'ifosfamide) sont capables de réduire la toxicité mais des lésions urothéliales subcliniques et une raréfaction des couches urothéliales peuvent tout de même être observées.
- Par la suite, face au traitement immunosuppresseur administré en prophylaxie de la GVH et des réponses systémiques à l'inflammation dues au conditionnement, une réactivation du BKPyV est observée.
- Enfin, comme la régénération des cellules urothéliales est altérée après le conditionnement, la réplication importante du BKPyV entraîne une dénudation de l'épithélium vésical raréfié qui a pour conséquences des fuites d'urine, une inflammation et une hémorragie. L'inflammation peut être encore aggravée après la greffe en raison d'un syndrome inflammatoire lié à la reconstitution immunitaire

### 3) *BKPyV et oncogenèse*

Le pouvoir oncogène des polyomavirus est établi. En effet, comme cela a été évoqué précédemment, le terme « polyoma » vient du grec et signifie « multiples tumeurs ». Le premier polyomavirus isolé d'une souris était à l'origine de multiples carcinomes des glandes salivaires chez des souris.<sup>8</sup> De la même manière, le carcinome à cellules de Merkel est le premier cancer humain clairement lié aux polyomavirus (polyomavirus de Merkel).<sup>177</sup> Aujourd'hui, le BKPyV est classé dans la catégorie 2B en tant que virus « possiblement carcinogène chez

l'homme » par le groupe de travail de l'Agence Internationale pour la Recherche contre le Cancer de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS).<sup>178</sup> *In vitro*, une transformation oncogénique des lignées cellulaires de rongeurs a été observée après une infection par le virus.<sup>176</sup> De nombreux cas cliniques de cancer rénaux et des voies urinaires avec une intégration du génome du virus ont été décrits dans la littérature.<sup>179-182</sup> De plus, les patients qui développent une virémie à BKPyV ou une néphropathie associée au BKPyV après une transplantation rénale ont un risque de cancer de la vessie de 4 à 11 fois plus élevé que les transplantés sans maladie à BKPyV.<sup>183-185</sup> Le pouvoir oncogène serait lié à la région précoce codant les protéines de la réplication LTA et STA. De nombreux facteurs pourraient contribuer à ce phénomène mais ne sont pas encore précisément investigués : inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs p53 et pRB par la protéine LTA du BKPyV, instabilité génomique liée au BKPyV, activation des voies de proliférations cellulaires, inhibition de l'apoptose cellulaire et induction de l'angiogenèse.<sup>176,186</sup>

Trois mécanismes physiopathologiques hypothétiques sont mis en exergue pour expliquer ce pouvoir oncogène<sup>186</sup> :

- Un mécanisme direct persistant : le virus infecte une cellule épithéliale et, par l'expression d'oncogènes viraux et la promotion de l'instabilité du génome cellulaire, transforme la cellule. En l'absence de la mort cellulaire tumorale à médiation immunitaire, la cellule transformée se développe en une tumeur BKPyV-positif.
- Un mécanisme direct transitoire (également connu sous le nom "*hit-and-run*") : l'instabilité du génome cellulaire médiée par le virus favorise l'accumulation de mutations, permettant éventuellement à une population de cellules tumorales de perdre l'expression d'oncogènes viraux. Les cellules exprimant des oncogènes

viraux sont ciblées par le système immunitaire conduisant à une tumeur BKPyV-négative. Ce mécanisme sous-estimerait donc la fréquence des tumeurs BKPyV induites.

- Un mécanisme indirect : BKPyV infecte une cellule endothéliale adjacente à une cellule épithéliale pré-cancéreuse. La cellule endothéliale infectée exprime des cytokines qui recrutent des cellules immunitaires favorisant la tumeur. La cellule épithéliale pré-maligne subit une transformation et se développe en une tumeur BKPyV-négative.

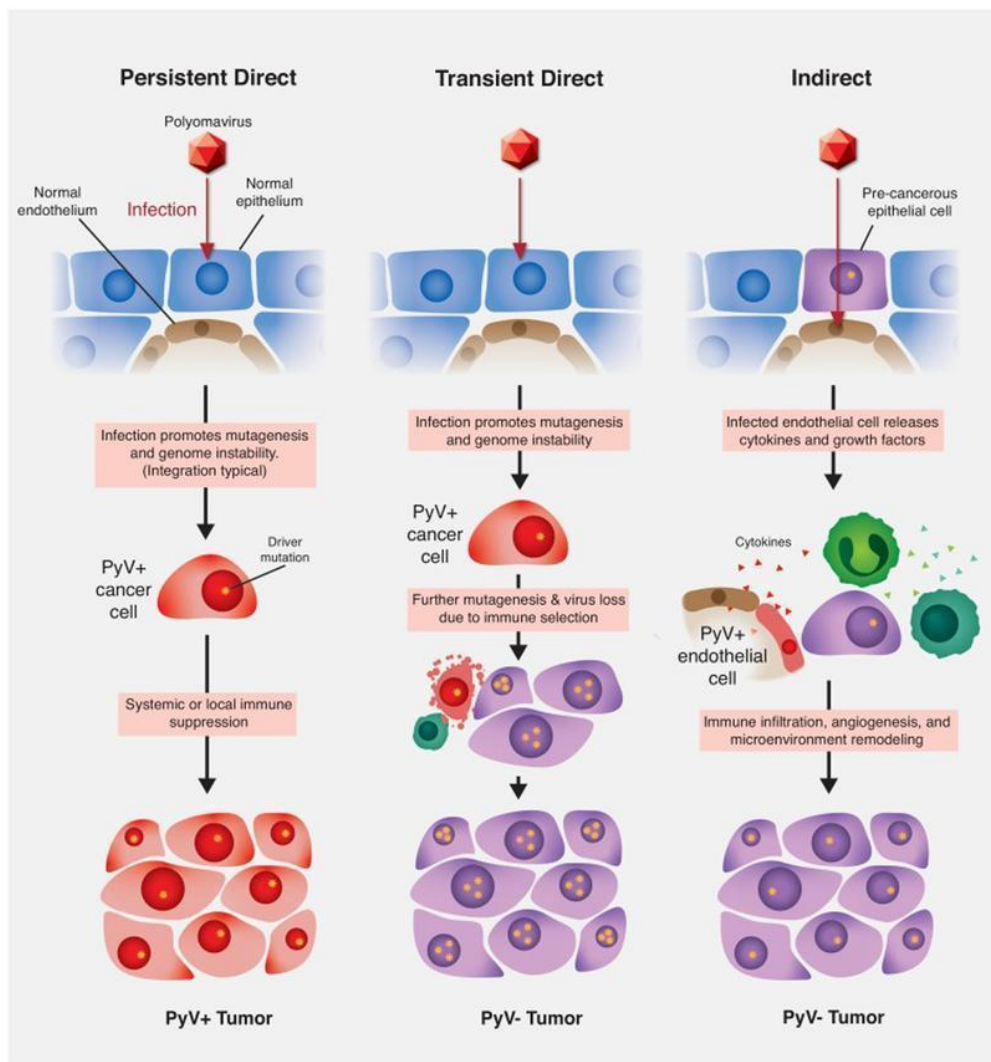


Figure 14. Hypothèses physiopathologiques du pouvoir oncogène du BKPyV. D'après Starrett *et al.*<sup>186</sup>

#### **4) *Autres atteintes liées au BKPyV chez le transplanté rénal et le non-transplanté***

Le BKPyV peut être à l'origine de sténoses urétérales. Le virus a d'ailleurs été isolé pour la première fois chez un patient transplanté rénal avec sténose urétérale en 1971 et porte un nom provenant des initiales de cet individu.<sup>12</sup> Depuis, d'autres cas ont été décrits chez la population de transplantés rénaux.<sup>187,188</sup> Des sténoses urétérales peuvent aussi survenir chez des patients ayant une greffe de cellules souches hématopoïétiques et d'autres patients immunodéprimés.<sup>189</sup>

Des études sur des modèles animaux ont montré que l'épithélium urétéral permet la réplication de certains polyomavirus. À la suite de l'inflammation et de l'apoptose des cellules de la paroi urétérale, le tissu serait remplacé par du tissu cicatriciel à l'origine de la sténose.<sup>190</sup>

Des cas de méningo-encéphalites, de leucoencéphalopathies multifocales progressives ainsi que des cas de pneumonies ont été également rapportés, essentiellement chez des patients greffés de cellules souches hématopoïétiques et dans certains cas chez des patients présentant une infection au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) au stade de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) et même chez le transplanté rénal.<sup>191-195</sup> De plus, une atteinte dermatologique associée à une cystite hémorragique chez un enfant greffé de moëlle<sup>196</sup>, une rétinite chez un patient infecté par le VIH<sup>197</sup>, et une vasculopathie avec fuite capillaire et défaillance multiviscérale chez un transplanté rénal<sup>198</sup> ont été décrits dans la littérature.

### **J. Diagnostic de la néphropathie à BKPyV**

#### **1) *Diagnostic biologique***

Les méthodes de dépistage recommandées des pathologies liées au BKPyV reposent sur la détection des signes de réplication virale dans les urines et dans le plasma ou le sang total par une réaction en chaîne par polymérase (*polymerase chain reaction*, PCR) quantitative (qPCR) en temps réel. Le plasma est préféré au sang total car ce dernier présente une plus grande

variabilité de mesure. Des différences de charges virales de BKPyV supérieures à 0,5 log<sub>10</sub> copies/mL entre certains laboratoires utilisant des dosages commerciaux ou développés en laboratoire ont été observées.<sup>199,200</sup> Les polymorphismes du BKPyV, à savoir le nombre et la position des mutations dans les gènes ciblés par l'amplification, sont apparus comme des sources majeures de variabilité inter-laboratoire. La diversité des méthodes de purification de l'ADN a également contribué à cette variabilité, en particulier pour les échantillons d'urine. De plus, le transport, le stockage, la congélation et la décongélation prolongés réduisent considérablement la charge plasmatique de BKPyV dans le plasma et doivent être évités.<sup>119,199</sup> La variabilité observée peut avoir des conséquences cliniques importantes. Si les charges de BKPyV sont sous-quantifiées ou indétectables, le risque de néphropathie à BKPyV est alors augmenté. À l'inverse, une surestimation des charges de BKPyV peut entraîner une réduction inappropriée de l'immunosuppression, risquant le rejet. L'utilisation de qPCR ciblant les régions hautement conservées des gènes codants (STA/LTA ou VP1/VP2/VP3) permet de réduire la variabilité.<sup>199</sup> De plus, comme la charge plasmatique de BKPyV est principalement constituée d'ADN hautement fragmenté, l'utilisation d'amplicons d'une longueur inférieure à 100 paires de base réduirait également la sous-quantification de la charge de BKPyV.<sup>134</sup> L'introduction d'un standard international de l'OMS pour le BKPyV est aussi une étape importante pour normaliser les tests du BKPyV entre les laboratoires. Cependant, la norme internationale OMS BKPyV se compose de plusieurs sous-populations de BKPyV, et la quantification virale varie jusqu'à 4 fois selon la région ciblée par les PCR. En effet, environ 70% de la population BKPyV- retrouvée dans le standard international présente des délétions dans la région codant la protéine LTA.<sup>201</sup>

La virurie BKPyV précède le début de la virémie. La recherche de la virurie a une sensibilité élevée et une valeur prédictive négative proches de 100 %.<sup>136,202-204</sup> Le dépistage des échantillons d'urine permet une détection plus précoce mais la valeur prédictive positive pour

la néphropathie à BKPyV n'est que de 40 %. La recherche d'une virémie BKPyV a une valeur prédictive positive plus élevée que la charge urinaire en BKPyV (aux alentours de 50 à 60 %).

La recherche de « *decoy cells* » ou cellules leurres en cytologie urinaire est une méthode peu coûteuse. Sa valeur prédictive négative pour exclure la néphropathie à BKPyV est de près de 100 %. Néanmoins, la valeur prédictive positive est faible à environ 25 %.<sup>204,205</sup> Les *decoy cells* sont des cellules épithéliales infectées par le virus qui peuvent être trouvées dans l'urine. Ces cellules leurres doivent leur nom à leur forte ressemblance avec les cellules cancéreuses et peuvent, à ce titre, confondre le diagnostic d'une infection virale ou d'une malignité urothéliale (figure 15). Ces cellules présentent un grand noyau basophile contenant des inclusions intranucléaires. Cette méthode de dépistage de la réplication BKPyV est recommandée en cas d'indisponibilité de la qPCR.

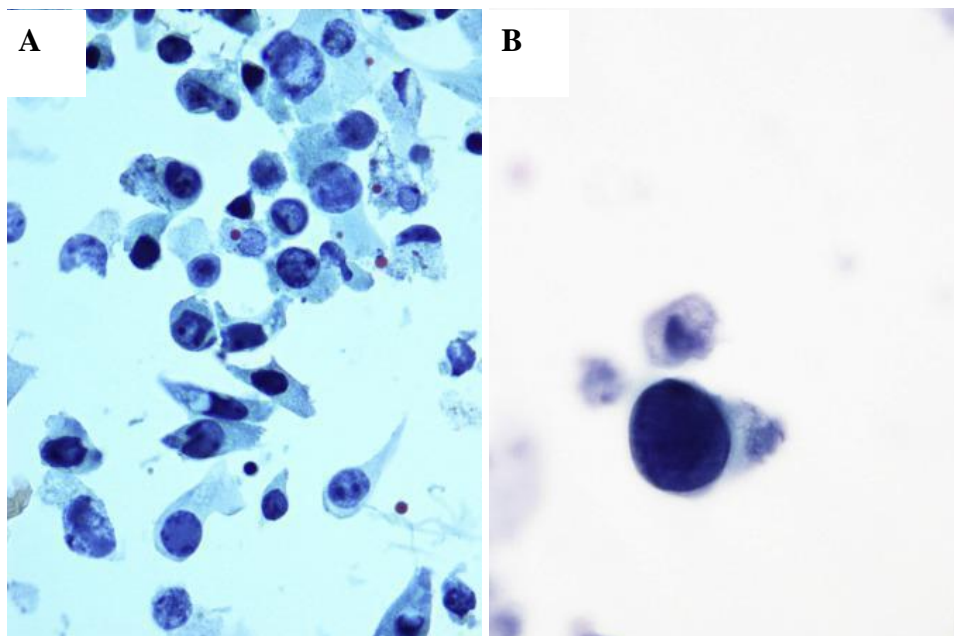


Figure 15. Illustration de Decoy cells.

A Decoy cells, coloration de Papanicolaou, 400×. B Decoy cell, coloration de Papanicolaou, 1000 ×. D'après Chantziantoniou *et al.*<sup>206</sup>

La visualisation de Haufen en microscopie électronique est une autre technique diagnostique (figure 16). Les Haufen sont des agrégats icosaédriques de particules de polyomavirus et de protéine de Tamm-Horsfall qui peuvent être détectés dans l'urine de patients transplantés rénaux atteints de néphropathie à BKPyV à l'aide d'une microscopie électronique à coloration négative. La présence de Haufen dans l'urine était fortement corrélée (coefficient kappa k à 0,98) avec la néphropathie à BKPyV avec une sensibilité et une spécificité > à 98 %.<sup>207, 208</sup> De plus, les résultats du test quantitatif PyV-Haufen reflétaient la gravité de la maladie rénale avec un coefficient de corrélation de 0,84. Ces deux études menées dans un même centre nécessitent une confirmation par des études plus approfondies.

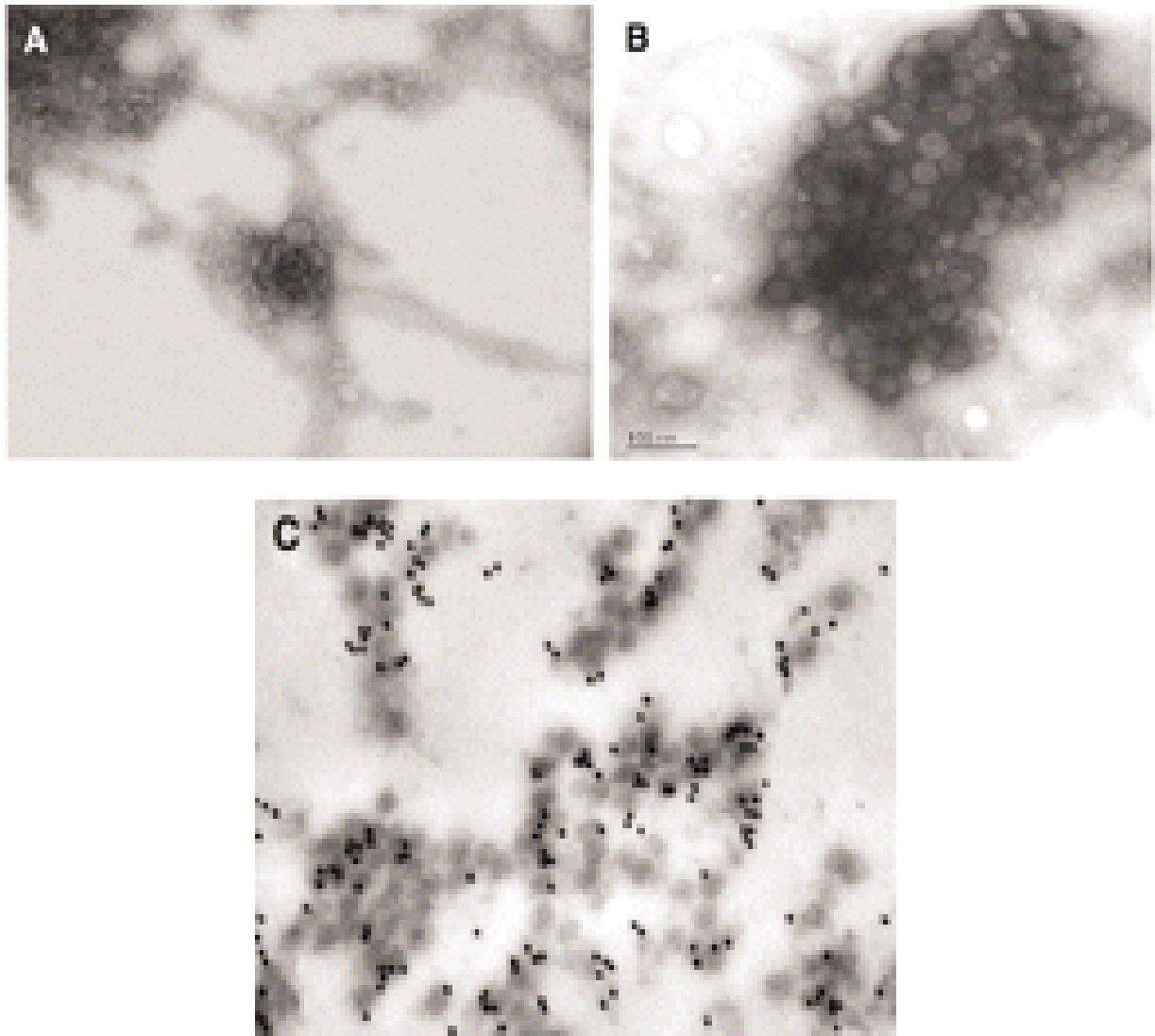


Figure 16. Agrégats tridimensionnels de polyomavirus en forme de cristaux, appelés Haufen, dans des échantillons d'urine.

A, Un petit Haufen (neuf virions) ; B, Un grand Haufen (> 100 virions) ; C, Les Haufen sont riches en protéine Tamm-Horsfall (marquée par les points noirs représentant des particules d'or). A et B, coloration négative, microscopie électronique, contre-coloration à l'acétate d'uranyle ; C, marquage immunogold microscopie électronique avec un anticorps monoclonal de souris anti-humain Tamm-Horsfall, particules d'or de 5 nm. D'après Singh HK *et al.*<sup>207</sup>

## 2) *Diagnostic histologique*

Le diagnostic de certitude de la néphropathie à BKPyV repose sur l'analyse anatomopathologique du tissu rénal obtenu par une ponction-biopsie du greffon (PBG). Il s'agit de la méthode de référence. La PBG doit être envisagée principalement chez les patients présentant une insuffisance rénale ou des marqueurs indiquant un risque immunologique accru, tels que les patients hyperimmunisés, la présence d'anticorps anti-donneur (*donor specific antibody*, DSA), une greffe ABO incompatible, des antécédents de rejet ou de transplantation. En raison de la nature focale de la néphropathie à BKPyV au début de la maladie, le taux de faux négatifs peut aller jusqu'à 40 % des cas.<sup>209,210</sup> Ce taux peut être réduit si au moins deux prélèvements sont effectués, de préférence au niveau de la médullaire rénale, réservoir important de l'infection à BKPyV. La réplication virale intra-rénale peut être mise en évidence par l'utilisation des techniques d'immunohistochimie employant des anticorps dirigés contre la protéine LTA du SV40, un polyomavirus simien présentant une forte homologie avec le BKPyV. Le spectre morphologique change avec le temps (figure 17). Les changements morphologiques associés à la néphropathie à polyomavirus ont été divisés en 3 stades caractérisant l'évolution de la maladie.<sup>211</sup> Ces stades sont utilisés dans la classification de l'*American Society of Transplantation*.<sup>212</sup>



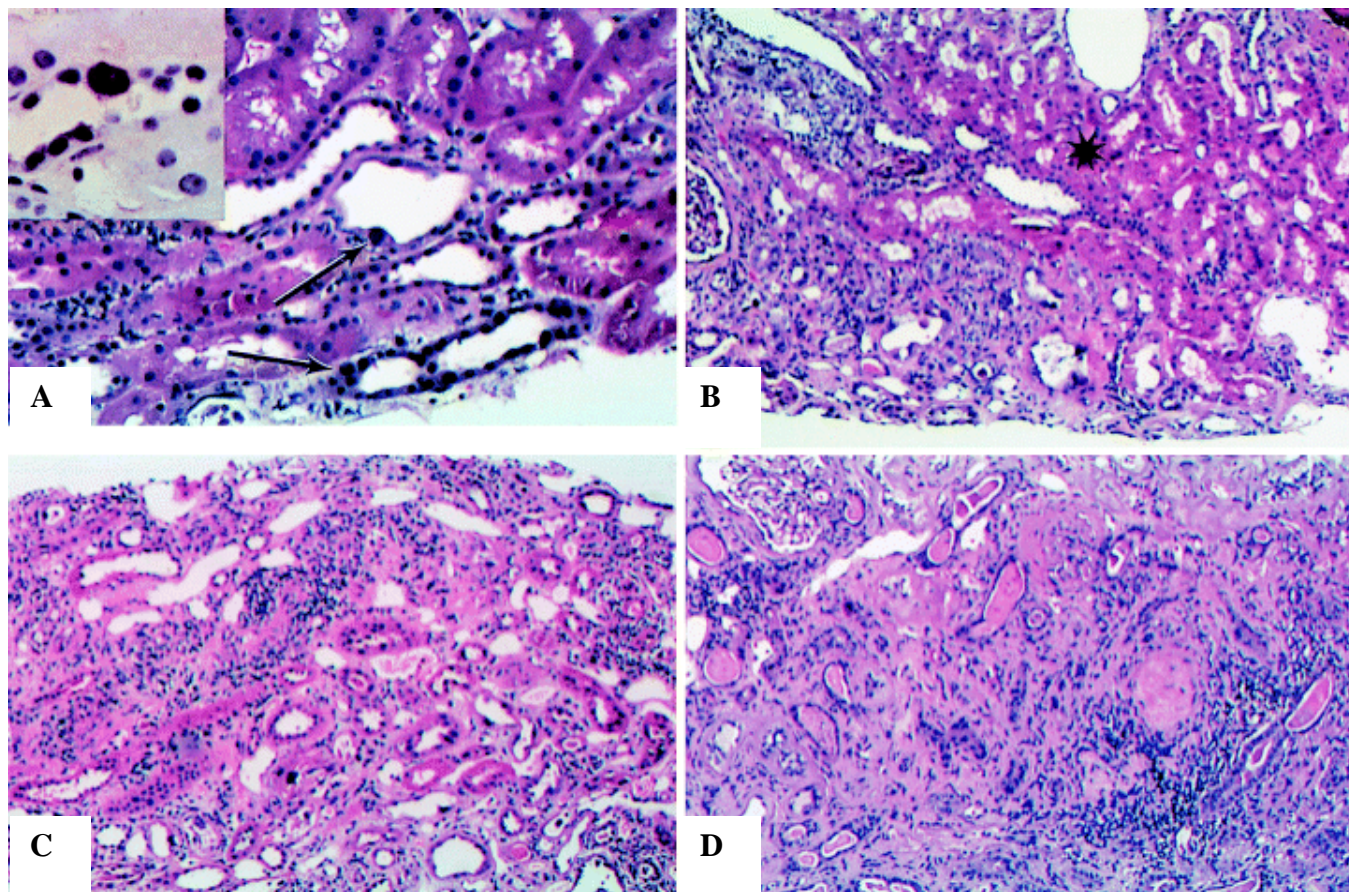


Figure 17. Biopsies en série chez un transplanté rénal avec une réactivation du BKPyV.

A, La biopsie initiale montre des tubules avec des modifications cytopathiques (flèches). Le tubule montre un seul noyau nettement élargi mis en évidence par une coloration à l'immunoperoxydase pour polyomavirus ; B, Néphrite tubulo-interstitielle. La partie supérieure droite de l'image montre un parenchyme non atteint (astérisque). La partie inférieure gauche montre une inflammation chronique, une atrophie et des modifications cytopathiques virales ; C, Une biopsie ultérieure montre une atteinte diffuse de la néphrite tubulo-interstitielle à BKPyV. L'atrophie est plus importante ; D, Sept mois après le diagnostic, la biopsie montre une fibrose interstitielle étendue et une atrophie tubulaire, ainsi qu'une sclérose glomérulaire diffuse. Il existe de rares modifications cytopathiques virales résiduelles. D'après Drachenberg RC *et al.*<sup>211</sup>

Lors du stade A de la maladie, des changements cytopathiques/cytolytiques liés au virus dans les tubules +/- associés à des infiltrats inflammatoires mineurs sont observés. Dans le stade B, les modifications liées au virus sont associées à une atteinte tubulaire plus sévère, une inflammation interstitielle focale ou diffuse, une tubulite, une fibrose interstitielle et une atrophie tubulaire. En fonction de l'étendue de la zone de biopsie affectée, le stade peut être subdivisé en sous-catégories B1, B2 et B3. Le stade C est caractérisé par une fibrose

interstitielle étendue avec une atrophie tubulaire et une inflammation interstitielle. Les modifications cytopathiques virales sont extrêmement rares, voire absentes. La seconde classification, proposée par le *Banff Working Group on polyomavirus nephropathy*, repose sur un score semi-quantitatif déterminant le nombre de cellules infectées par le BKPyV (*polyoma virus load*, pvl) et le score de fibrose interstitielle « ci » de Banff gradé chacun en trois classes pour définir trois stades.<sup>213</sup> Les études initiales des deux classifications ont montré que la fonction rénale et le risque de perte du greffon étaient prédits par les stades. Malheureusement, les études de validation ont montré des résultats mitigés, seules quelques études soutiennent les conclusions initiales.<sup>214-217</sup>

Le principal diagnostic différentiel de la néphropathie à BKPyV est le rejet cellulaire aigu.<sup>212</sup> Comme la néphropathie à BKPyV, il existe des lésions tubulo-interstitielles. La présence d'un effet cytopathique ou des cellules marquées au SV40 plaident en faveur d'une inflammation et d'une tubulite liées au BKPyV, mais leur absence dans un foyer d'inflammation interstitielle n'exclut pas une infection au BKPyV comme cause. L'artérite intinale ainsi que la vasculopathie chronique de l'allogreffe, qui peut être observée dans le rejet, ne peuvent généralement pas être associées à la néphropathie à BKPyV. Cependant, un cas de néphropathie à BKPyV avec une artérite intinale et un cas avec une vasculopathie généralisée à polyomavirus dans le muscle squelettique ont été rapportés.<sup>198,218</sup>

### 3) *Définitions diagnostiques et recommandations*

À partir des différents moyens diagnostiques, plusieurs définitions ont été établies :<sup>212</sup>

- Néphropathie à BKPyV possible : virurie de haut niveau  $> 7 \log_{10}$  copies/mL et/ou présence de decoy cells
- Néphropathie à BKPyV probable : virémie  $> 3 \log_{10}$  copies/mL pendant  $> 2$  semaines

- Néphropathie à BKPyV présumée : virémie  $> 4 \log_{10}$  copies/mL
- Néphropathie à BKPyV prouvée : biopsie rénale montrant des modifications liées au virus

En transplantation rénale, il est recommandé de réaliser un dépistage de la réplication BKPyV par qPCR tous les mois jusqu'au 9<sup>ème</sup> mois post-greffe, puis tous les 3 mois jusqu'à 2 ans après la greffe et lorsqu'une PBG est réalisée. Selon les centres de transplantation, une recherche de virurie, decoy cells et virémie peut être faite en 1<sup>ère</sup> intention. Si seuls des échantillons d'urine sont testés pour la surveillance de la charge de BKPyV, des tests de suivi dans le plasma doivent être envisagés lorsque les charges de BKPyV dans l'urine dépassent  $7 \log_{10}$  copies/mL ou si une suspicion clinique de néphropathie à BKPyV est élevée malgré une charge virale urinaire indétectable.<sup>212</sup> En effet, il y a eu quelques cas isolés de patients développant une virémie sans virurie, mais cela est inhabituel. La figure 18, issue des recommandations de *l'American Society of Transplantation*, détaille la méthode de dépistage et de diagnostic de la néphropathie à BKPyV chez le transplanté rénal.

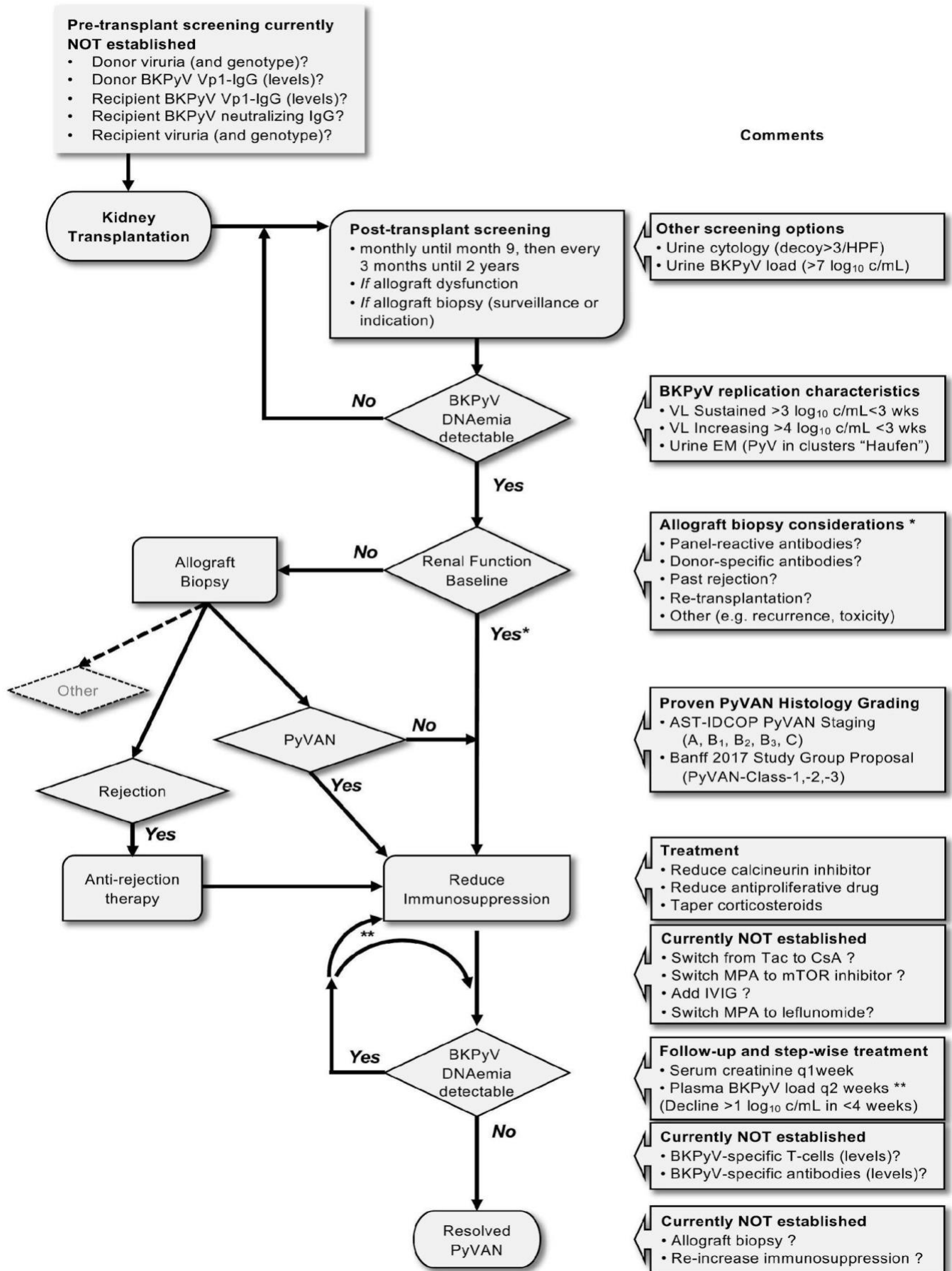


Figure 18. Dépistage et prise en charge des patients transplantés rénaux atteints de virurie BKPyV, de virémie et de néphropathie à BKPyV.

Abréviation : c/mL, copies/mL ; CsA, cyclosporine-A ; DSA, anticorps spécifique du donneur ; EM, microscopie électronique ; HPF, champ haute puissance ; IgIV, préparations intraveineuses d'immunoglobulines ; MPA, acide mycophénolique ou équivalent ; PyV, polyomavirus ; Tac, tacrolimus ; LV, charge virale. \*La biopsie du greffon doit être envisagée chez les patients présentant une fonction rénale non dégradée, si un rejet aigu concomitant (subclinique) est probable. \*\* Si la baisse de la virémie BKPyV plasmatique est  $< 1 \log_{10}$  copies/mL en moins de 4 semaines.

## **K. Traitements de la néphropathie à BKPyV**

### **1) *Baisse de l'immunosuppression***

A ce jour, la modification de l'immunosuppression est le seul traitement formellement efficace contre la néphropathie à BKPyV. Cette réduction permet de restaurer l'immunité anti-BKPyV nécessaire au contrôle de la réplication du virus. Dorénavant, la réduction de l'immunosuppression est recommandée au stade de néphropathie à BKPyV probable, présumée ou prouvée.<sup>212</sup> Cette réduction de l'immunosuppression permet de réduire la virémie et conduirait à la régénération des cellules tubulaires.<sup>219</sup>

Des données *in vitro* ont montré que des concentrations de tacrolimus supérieures à 6 ng/mL inhibent l'activation des lymphocytes T spécifiques du BKPyV de plus de 50 %, alors qu'une inhibition inférieure à 30 % a été observée avec des concentrations en dessous de 3 ng/mL. L'inhibition par la cyclosporine était supérieure à 50 % à des concentrations de 1920 ng/mL et inférieure à 30 % en dessous de 960 ng/mL, ce qui correspond à des niveaux cliniques de taux résiduels de 200 et 100 ng/mL, respectivement.<sup>220</sup> Les concentrations de MMF jusqu'à 8 µg/mL, de léflunomide à 50 µg/mL ou de sirolimus à 64 ng/mL n'ont pas inhibé la production d'interféron- $\gamma$  spécifique au BKPyV, mais l'expansion des cellules T dépendantes de l'antigène.

Sur des cultures cellulaires, la réplication du BKPyV est inhibée par l'acide mycophénolique et la ciclosporine.<sup>221-224</sup> Les données sur les inhibiteurs de mTOR semblent contradictoires avec d'un côté un effet inhibiteur de la réplication du virus et de l'autre une possible majoration de cette réplication.<sup>223,225,226</sup>, tandis que le tacrolimus activait la réplication du BKPyV et inversait l'inhibition causée par le sirolimus.<sup>223</sup>

*In vivo*, une méta-analyse<sup>227</sup> et de multiples études observationnelles ont rapporté une négativation de la virémie BKPyV dans 80 % à 100 % des cas après réduction de l'immunosuppression.<sup>137,219,228-230</sup> Dans les néphropathies à BKPyV prouvées, une réduction plus importante est nécessaire pour obtenir la clairance virale.<sup>219</sup>

Le moment du diagnostic (post-transplantation précoce ou tardive), l'importance de la virémie initiale, les circonstances de diagnostic (en tant que dépistage de routine ou en tant que diagnostic différentiel de dysfonctionnement du greffon), ainsi que le risque de rejet aigu guident la manière de réduire l'immunosuppression. Chez les patients traités par des inhibiteurs de la calcineurine et un antimétabolite, il existe deux stratégies de réduction<sup>212</sup> :

- Stratégie 1 : réduction initiale de la dose d'inhibiteur de la calcineurine de 25 % à 50 % en une ou deux étapes, suivie d'une réduction antiproliférative de 50 %, puis arrêt de l'antiprolifératif.
- Stratégie 2 : réduction d'abord du traitement antiprolifératif de 50 %, ensuite réduction des inhibiteurs de la calcineurine de 25 % à 50 %, puis arrêt du médicament antiprolifératif.

La prednisone orale est généralement baissée à 10 mg par jour ou moins. L'immunosuppression est en outre ajustée en fonction de la charge plasmatique de BKPyV et des modifications de la fonction rénale lors du suivi qui doit être réalisé au moins toutes les 2 semaines. Le remplacement du tacrolimus par la ciclosporine peut également être envisagé.<sup>231</sup>

Un rejet aigu et un DSA *de novo* peuvent se développer chez environ 10 % des patients après élimination de la virémie BKPyV.<sup>137,219,228,232-235</sup> Ce risque est accru si l'immunosuppression est réduite plus rapidement.<sup>236</sup>

## 2) *Thérapies associées et adjuvantes*

### (a) **Les inhibiteurs de mTOR**

Les inhibiteurs de mTOR sont considérés comme un potentiel traitement anti-BKPyV. Certaines données *in vitro* ont montré que les inhibiteurs des mTOR pourraient inhiber la réplication virale. De plus, des études chez des transplantés rénaux recevant des inhibiteurs des anti-calcineurines et des corticostéroïdes ont montré une incidence plus faible de la virémie et de la néphropathie à BKPyV chez les patients recevant des inhibiteurs de la voie des mTOR par rapport au mycophénolate.<sup>164,237</sup> Aujourd'hui, il existe peu de données indiquant un switch vers ce traitement après une réplication à BKPyV. Le plus grand essai randomisé contrôlé qui comporte 40 patients n'a pas montré une différence significative entre le switch du MMF à l'évérolimus et une réduction de la dose de MMF en ce qui concerne l'élimination de la virémie ou la réduction de 50 % de la virurie.<sup>238</sup> Des études sur une cohorte plus large sont nécessaires pour confirmer ou infirmer ces données.

### (b) **Immunoglobulines intraveineuses (IgIV)**

Les IgIV contiennent des titres élevés d'anticorps neutralisants contre le virus BKPyV, en particulier contre le génotype le plus courant (génotype I), et leur injection permet une augmentation significative du titre des anticorps neutralisants chez les greffés rénaux.<sup>82,239</sup> De plus, ils possèdent des effets immunomodulateurs qui peuvent atténuer les effets lytiques des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ antiviraux qui infiltrent le rein et contribuent aux dommages tubulaires « collatéraux » d'une réponse antivirale importante.<sup>240</sup> Enfin, les IgIV ont le potentiel de prévenir le rejet suite à une réduction de l'immunosuppression. Dans une étude rétrospective comparative, sur 50 receveurs de reins atteints d'une néphropathie à BKPyV principalement au

stade histologique B (92 %), les patients traités par des IgIVs associées à la baisse de l'immunosuppression évoluaient plus vers une virémie négative (77,3 % versus 33,3 %,  $p = 0,044$ ) que les patients ayant juste eu une réduction de l'immunosuppression. À l'inverse, l'étude rétrospective comparative de Naef *et al.* ne montre pas de bénéfice des IgIVs dans la clairance virale et dans l'incidence des rejets. Mais il faut noter que les patients du groupe IgIV ( $n = 52$ ) avaient une réduction plus importante de l'immunosuppression ( $n = 79$ ).<sup>241</sup> Des études randomisées contrôlées sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

### (c) Cidofovir

Le cidofovir est un analogue nucléosidique qui inhibe l'activité de l'ADN polymérase virale. Il a une activité *in vitro* contre le BKPyV. Mais ce dernier ne code pas d'ADN polymérase. L'activité *in vitro* du cidofovir contre le BKPyV serait liée à une diminution de l'activité métabolique de l'ADN cellulaire de l'hôte.<sup>242,243</sup> Il est administré par voie intraveineuse et a des effets secondaires connus, notamment la néphrotoxicité, l'uvéite antérieure et la myélosuppression.<sup>242,244</sup> Certaines études rapportent une stabilisation de la fonction rénale, alors que d'autres ne rapportent aucun bénéfice démontrable. Des taux sanguins maximaux de 5 µg/mL ont été atteints, ce qui est inférieur à la concentration inhibitrice 90% du BKPyV (40 µg/mL). La méta-analyse d'une étude de cohorte et de 11 séries de cas n'a trouvé aucun avantage du cidofovir dans la prise en charge de la réplication du BKPyV.<sup>227</sup>

### (d) Brincidofovir

Le brincidofovir est le dérivé ester lipidique du cidofovir.<sup>245-247</sup> Son activité *in vitro* nécessite des concentrations 400 fois plus basses que le cidofovir.<sup>246</sup> Il est également moins néphrotoxique que le cidofovir.<sup>245-247</sup>

Dans des cultures de cellules urothéliales humaines primaires, un traitement pré-infection pendant seulement 24 h a réduit l'infectivité de la même manière qu'un traitement 2 à 72 h après



l'infection, tandis qu'un traitement combiné pré- et post-infection a une meilleure efficacité. L'utilisation de ce traitement a été rapportée chez un patient greffé de cellules souches hématopoïétiques présentant une néphropathie à BKPyV et une patiente pédiatrique transplantée du rein. Sous brincidofovir, la charge virale BKPyV a diminué sans négativation et la fonction rénale s'est stabilisée.<sup>248,249</sup> Une étude multicentrique de phase 1/2, randomisée, en double aveugle, contrôlée versus placebo et à doses multiples sur l'innocuité, la tolérance et la pharmacocinétique du brincidofovir chez des receveurs de greffe de cellules souches hématopoïétiques et rénales atteints de virurie BKPyV, a été achevée (NCT00793598).<sup>250</sup> Cependant, les résultats ne sont pas disponibles.

#### (e) Leflunomide

Le léflunomide est un agent antiprolifératif et immunosuppresseur utilisé à l'origine pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Le métabolite actif, le tériflunomide (A771726), inhibe la prolifération des lymphocytes T et B. *In vitro*, il a été observé que le léflunomide inhibe la réplication du BKPyV en modulant l'activité de la pyrimidine/tyrosine kinase/dihydroorotate déshydrogénase.<sup>243</sup> L'effet inhibiteur *in vitro* était contrecarré par l'ajout d'uridine à des concentrations normalement trouvées *in vivo*.<sup>251</sup>

Dans la prise en charge du BKPyV, il est pris par voie orale en remplacement de l'acide mycophénolique. Plusieurs études ont rapporté l'utilisation du léflunomide dans la néphropathie au BKPyV.<sup>252-259</sup> Ces études présentent des résultats discordants sur la clairance virale. Mais ce sont des études observationnelles sans groupes contrôles. De plus, les patients avaient bénéficié d'une baisse de l'immunosuppression rendant l'interprétation des résultats difficile. Un essai contrôlé randomisé de phase 2 a évalué le FK778, un dérivé du léflunomide dans la néphropathie à BKPyV mais n'a montré aucun bénéfice. Le traitement par FK778 a diminué la

charge virale du BKPyV dans cette étude, mais il a été associé à un profil de rejet et une fonction rénale moins favorables et à une incidence plus élevée d'effets indésirables graves.<sup>260</sup>

#### (f) Fluoroquinolones

Les fluoroquinolones sont des antibiotiques qui ont montré une activité inhibitrice modeste sur la réplication du BKPyV *in vitro*. Cet effet inhibiteur est probablement médié par le blocage de la fonction hélicase de la protéine LTA du virus.<sup>261,262</sup> Deux essais randomisés en double aveugle contrôlés contre placebo n'ont pas montré de bénéfice des fluoroquinolones dans la prévention de la réplication BKPyV.<sup>263,264</sup> De même, un essai randomisé en double aveugle contrôlé n'a pas montré de réduction de la virémie BKPyV en utilisant la lévofloxacine pendant trois mois par rapport au placebo.<sup>265</sup> De plus il existe un risque accru d'infections résistantes aux fluoroquinolones.<sup>264</sup>

#### (g) Statines

Par l'inhibition de la synthèse du cholestérol, les statines diminuent l'expression de la cavéoline-1. La voie de l'endocytose cavéolaire est une étape critique pour l'entrée du BKPyV dans les cellules épithéliales tubulaires proximales rénales humaines. Une étude *in vitro* sur des cultures cellulaires épithéliales tubulaires proximales rénales humaines a constaté que le pourcentage de cellules infectées par le BKPyV et l'expression de l'antigène T étaient significativement diminués lorsqu'elles étaient exposées à la pravastatine.<sup>266</sup> Néanmoins, l'ajout de la pravastatine 72 heures après l'infection au BKPyV n'avait pas d'impact sur le pourcentage de cellules infectées. Par conséquent, les statines ne seraient pas efficaces une fois que l'infection est établie. De plus, l'exposition à la pravastatine dans cette étude *in vitro* était bien supérieure à la concentration sérique maximale de pravastatine chez l'homme (50 µM contre 0,1 µM, respectivement). De même, une étude rétrospective portant sur des transplantés de rein adultes atteints de virémie BKPyV a révélé que les statines à des doses maximisées pour les effets

hypocholestérolémiants n'empêchaient pas la progression de la virémie BKPyV vers la néphropathie à BKPyV.<sup>267</sup>

## **II. Conclusions et objectifs du travail de thèse concernant le BKPyV**

Cette revue de la littérature montre qu'en transplantation rénale, la réplication du BKPyV est une problématique majeure avec la survenue de néphropathie à BKPyV qui peut conduire à la perte du greffon. Comme nous l'avons vu, aucune thérapeutique n'a prouvé son efficacité sur le plan clinique malgré une efficacité *in vitro* de plusieurs molécules. La seule stratégie permettant le contrôle de la réplication du virus est la restauration de l'immunité anti-BKPyV via la baisse de l'immunosuppression. Mais cela expose le patient à un risque important d'immunisation contre le greffon rénal avec un risque de rejet.

En transplantation rénale, dans la majorité des cas, le BKPyV qui se réplique est issu du donneur qui le transmet au receveur via le rein et les voies urinaires transplantés.<sup>67,128,167</sup> Cette réplication se fait généralement les premiers mois de la greffe.<sup>136,141</sup> Un titre d'anticorps neutralisants faible contre la souche du donneur est un facteur de risque de réplication du BKPyV. Dans ce travail de thèse, nous évaluons l'impact d'un apport passif de NAb via des IgIV sur l'incidence de la virémie et de la néphropathie à BKPyV.

### **III. Les IgIV comme stratégie préventive de la réplication du BKPyV chez les transplantés de rein—Résultats d'une étude de preuve de concept**

#### **A. Rationnel de l'étude**

Des travaux menés dans notre équipe ont montré qu'un titre d'anticorps neutralisants anti-BKPyV ou NAb du donneur bas contre la souche du receveur présente un facteur de risque de réplication du virus chez le receveur. Un titre chez le receveur de NAb inférieur à  $4 \log_{10}$  de  $CI_{50}$  (concentration inhibitrice à 50 %) contre la souche du donneur au moment de la transplantation expose à un risque de virurie et de virémie à BKPyV plus important qu'un titre supérieur à  $4 \log_{10}$  de  $CI_{50}$ .<sup>128</sup> Par ailleurs, un autre travail de l'équipe ainsi que des données de la littérature montrent que l'ensemble des préparations d'IgIV testées contiennent une activité neutralisante anti-BKPyV contre les trois principaux génotypes (les génotypes I, II et IV).<sup>239,268</sup> En effet, les IgIV sont issues de dons de plasma de sujets sains et plus de 90 % de la population adulte est immunisée contre le BKPyV. L'injection de ces IgIV a conduit à une augmentation significative du titre d'anticorps neutralisants contre les trois principaux génotypes et surtout contre le génotype I (le plus répandu). L'effet de cette augmentation persistait 3 à 4 semaines après l'injection.<sup>239</sup> Notre hypothèse de travail était qu'une augmentation du titre de NAb après l'injection d'IgIV chez les transplantés ayant un faible titre de NAb le jour de la transplantation aurait un effet protecteur vis-à-vis de la réplication BKPyV.

Dans une étude rétrospective, qui fera l'objet de la première partie de la thèse et qui a fait l'objet d'une publication dans *l'American Journal of Transplantation*, nous avons étudié l'impact des IgIV dans la prévention de la virémie et de la néphropathie à BKPyV dans une cohorte de transplantés rénaux.

## **B. Principaux points de méthodologie**

### *1) Population d'étude*

Nous avons analysé rétrospectivement les dossiers cliniques de patients adultes ayant bénéficié d'une transplantation rénale au CHU de Strasbourg entre juillet 2012 et décembre 2017. Tous les patients avec un titre de NAb mesuré le jour de la transplantation (J0) ont été jugés éligibles. Les patients ayant une survie inférieure à 3 mois ou une survie du greffon inférieure à 3 mois ont été exclus de l'étude. Les patients avec des titres NAb inférieurs à 4 log<sub>10</sub> de CI<sub>50</sub> contre la souche du donneur (qui a été déterminée en mesurant les titres NAb dans les sérums du donneur) ont été considérés à haut risque. Lorsque l'échantillon du donneur n'était pas disponible, la souche répliquante était considérée comme référence pour les patients présentant une répllication du BKPyV. Ce choix a été motivé par le fait que la répllication du BKPyV a principalement pour origine le BKPyV provenant du donneur. Le génotype viral le plus courant (génotype I) a été pris comme référence pour les patients n'ayant pas présenté de répllication durant le suivi. Sur la base des titres des anticorps neutralisants à J0 et de la prescription d'une perfusion d'IgIV, les patients de l'étude (n = 174) ont été répartis dans les trois groupes suivants : (1) les patients avec de faibles titres de NAb ("patients à haut risque") qui ont reçu un traitement par IgIV pour un déficit immunitaire secondaire ou pour la prévention ou le traitement du rejet médié par les anticorps au cours des 3 premiers mois post-transplantation et avant la répllication du BKPyV (n = 44), (2) les patients avec des titres NAb faibles ("patients à haut risque") qui n'ont pas bénéficié d'un traitement par IgIV au cours de la première année de la transplantation (n = 41), et (3) les patients avec des titres NAb élevés (« patients à faible risque ») qui n'ont pas reçu d'IgIV (n = 89). Le déficit immunitaire secondaire a été défini par des niveaux d'IgG < 400 mg/dL ou des niveaux d'IgG entre 400 et 800 mg/dL en présence d'une infection concomitante. Les patients à faible risque ayant reçu des IgIV au cours de la première année post-transplantation n'ont pas été inclus dans l'étude (n = 65).

## 2) *Test de neutralisation*

Les tests de neutralisation ont été réalisés sur des cellules HEK-293TT (*human embryonic kidney, National Cancer Institute Tumor repository, Frederick, Maryland, USA*). Les cellules HEK-293T sont générées après l'intégration du génome du polyomavirus SV40. Elles expriment de faibles quantités de la protéine LTA en raison d'un biais d'épissage en faveur de la protéine STA. Les cellules HEK-293TT sont issues des cellules HEK-293T après transfection par un plasmide codant la protéine LTA du SV40. Grâce à la forte expression de la protéine LTA du SV40, ces cellules ont la capacité de répliquer en grand nombre les plasmides contenant l'origine de réplication du SV40. Ces cellules étaient mises dans une plaque de 96 puits à raison de 30 000 cellules par puits. Les cellules étaient incubées pendant 2 à 5 heures à 37 °C. Le plasma du patient était décomplémenté. Il était ensuite dilué au 1/20<sup>ème</sup> puis sept dilutions en série au quart étaient réalisées. Ensuite, 25 µl de plasma aux différentes dilutions étaient mis en contact avec un volume de 100 µl de pseudovirions pour chacun des génotypes I, II et IV pendant 1 heure à 4 °C au sein d'une plaque de 96 puits. Les dilutions obtenues allaient du 1/100<sup>ème</sup> au 1/1638400<sup>ème</sup>. Les pseudovirions étaient formés par l'assemblage des trois protéines de la capsid autour du plasmide codant la Gaussia luciférase. Les mélanges pseudovirions-plasma aux différentes dilutions étaient utilisés pour infecter les cellules HEK-293TT. Du plasma frais congelé (PFC) dilué de la même manière que le plasma du patient était utilisé comme contrôle positif. L'infectiosité d'un sérum séronégatif pour le BKPyV mis en contact avec des pseudovirions, au sein de deux puits, représentait le contrôle négatif. L'infectiosité des pseudovirions seuls au sein de trois puits était le témoin d'infectiosité. Après 3 jours d'incubation, la neutralisation était déterminée par luminescence après ajout de 15 µl de substrat de Gaussia Luciférase dilué au 1/100<sup>ème</sup> avec 25 µl de surnageant de chaque dilution. La lecture se faisait par un luminomètre MicroBeta<sup>®</sup> Trilux (PerkinElmer<sup>®</sup>). La luminescence est proportionnelle à la réplication du plasmide de la Gaussia Luciférase et la

synthèse de la protéine Gaussia Luciférase. Cette synthèse dépend de la capacité d'infection des cellules par les pseudovirions et est donc inversement proportionnelle au titre de NAb. Le titre de neutralisation correspond à la dilution de plasma qui inhibe l'infection d'au moins 50 % par rapport au contrôle (CI<sub>50</sub>).

## C. Principaux résultats

### 1) *Cinétiques des NAb sous IgIV*

Parmi les 44 patients à haut risque traités par IgIV, un total de 41 patients (93,2 %) a reçu une perfusion d'IgIV dans le cadre d'un déficit immunitaire secondaire à une dose de 0,4g/kg. Parmi eux, 28 (63,6 %) ont bénéficié de 3 perfusions d'IgIV. Les 12 (27,3 %) et 1 (2,3 %) patients restants ont reçu respectivement 2 et 1 perfusions d'IgIV. Trois patients (6,8 %) ont été traités par 3 perfusions d'IgIV à la dose de 2 g/kg en raison d'un traitement préventif ou curatif de rejet humoral. Les IgIV étaient administrées au cours des 3 premiers mois post-transplantation. La cinétique des titres des NAb a été étudiée uniquement chez les patients ayant reçu des IgIV en l'absence de virémie BKPyV (n = 41, figure 19). Cette approche a permis d'étudier l'impact des IgIV en l'absence de stimulation du système immunitaire (en raison de l'augmentation des titres des NAb observée lors des virémies BKPyV). À J0, le titre moyen de BKPyV NAb était de 3,06 log<sub>10</sub> CI<sub>50</sub> avec un écart type (0,56) log<sub>10</sub> CI<sub>50</sub>. Avant la première injection d'IgIV, les titres de BKPyV NAb restaient inférieurs à 4 log<sub>10</sub> CI<sub>50</sub> chez tous les patients (moyenne : 3,07 [0,56] log<sub>10</sub> IC<sub>50</sub>). Un mois après la greffe, alors que la majorité des patients (93 %) avaient déjà reçu la première injection d'IgIV, les titres moyens de NAb ont augmenté de manière significative à 3,82 (0,61) log<sub>10</sub> CI<sub>50</sub> et sont restés à ces niveaux pendant les 2 mois suivants (p < 0,001). Une diminution des titres de NAb s'est produite par la suite, avec un retour aux niveaux initiaux entre 6 et 12 mois post-transplantation. Vingt-neuf des 32 patients (91 %) à haut risque du génotype I étaient capables d'atteindre un titre de NAb supérieur au seuil de 4 log<sub>10</sub> CI<sub>50</sub>. Seuls 2 patients sur 7 et 1 patient sur 2 parmi ceux à haut risque de réplication pour le génotype II et



génotype IV, respectivement, étaient capables d'obtenir un titre de NAb supérieur au seuil de  $4 \log_{10} \text{CI}_{50}$  (figure 19).

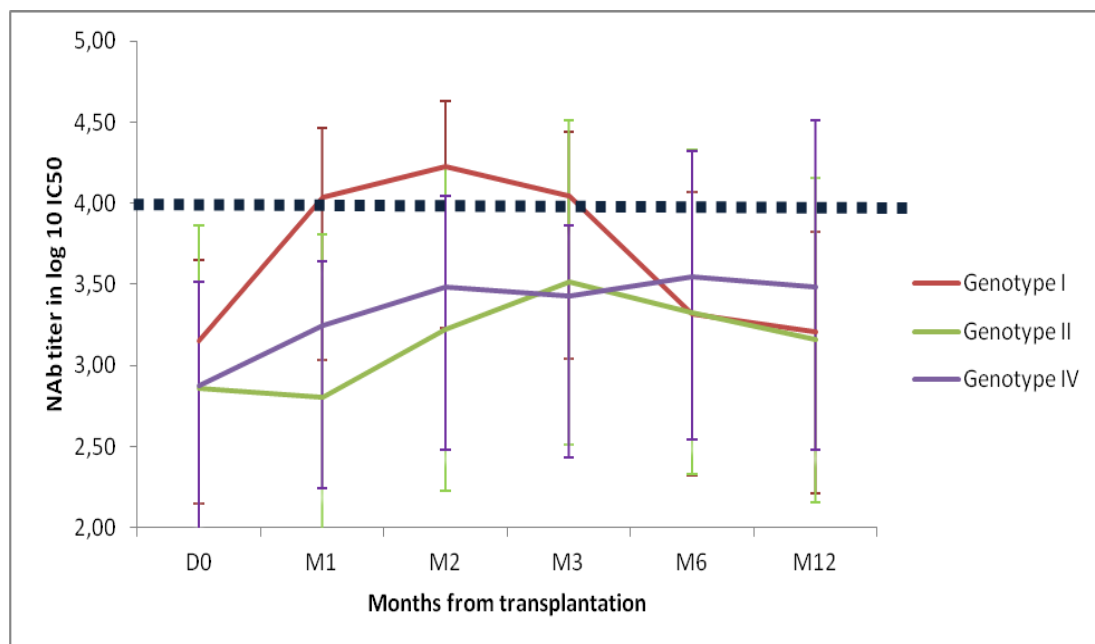


Figure 19. Cinétique des titres de NAb chez les transplantés rénaux ayant reçu des immunoglobulines intraveineuses.

Les titres de NAb sont rapportés sous forme de moyennes et d'écart types du jour de la transplantation au 12<sup>ème</sup> mois post-transplantation. Seules les données des patients qui n'ont pas présenté de virémie BKPyV sont prises en compte. Les courbes rouge, verte et violette représentent l'évolution des titres NAb moyens lorsque les souches ciblées étaient le génotype I (n = 32), II (n = 7) et IV (n = 2), respectivement. La ligne en pointillée indique le seuil de protection contre la réplication du BKPyV ( $4 \log_{10} \text{CI}_{50}$ ). L'administration d'IgIV a augmenté de manière significative les titres de NAb au cours des 3 premiers mois post-transplantation - bien que cet effet ait été principalement limité aux NAb dirigés contre le génotype I et beaucoup moins prononcé pour les NAb contre les génotypes II et IV. NAb : anticorps neutralisants.

## 2) *Incidence de la virémie BKPyV et de la néphropathie à BKPyV par groupe*

Une virémie BKPyV a été observée chez 27 des 174 patients de l'étude (incidence totale à 1 an post-transplantation : 15,5 %) après une médiane de 64 jours à partir de la transplantation (écart interquartile 25<sup>ème</sup>-75<sup>ème</sup> centiles, EI : 47,5-128,5 jours). Les génotypes BKPyV I et IV ont été identifiés comme souches répliquatives chez 23 (85 %) et 4 (15 %) patients, respectivement,

alors qu'aucun cas n'a montré de réplication de génotype II. Malgré la réduction de l'immunosuppression, 12 patients ont évolué vers une néphropathie à BKPyV prouvée par une biopsie (incidence totale à 1 an post-transplantation : 6,9 %) après une médiane de 93 jours à partir de la transplantation rénale (EI : 78,5-125 jours).

À 12 mois post-greffe, l'incidence de la virémie BKPyV dans le groupe à haut risque traité par IgIV (6,8 %, 3 patients sur 44) était similaire à celle observée dans le groupe à faible risque (10,1 %, 9 patients sur 88) et nettement inférieure à celle du groupe à haut risque non traité (36,6 % ; 15 patients sur 41 ;  $p < 0,001$  ; figure 20). Parmi les 3 patients à haut risque traités par IgIV qui présentaient une virémie BKPyV, deux d'entre eux n'ont pas pu atteindre le seuil protecteur de 4 log<sub>10</sub> CI<sub>50</sub> avant le premier épisode de virémie.

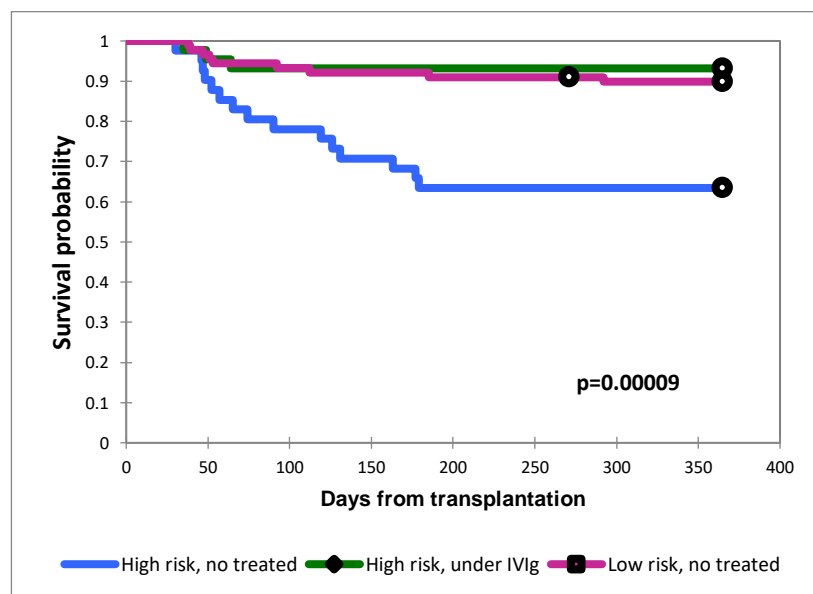


Figure 20. Courbes de Kaplan-Meier de la survie sans virémie BKPyV.

À 12 mois post-transplantation, l'incidence de la virémie BKPyV dans le groupe à haut risque traité par IgIV (6,8 %) était similaire à celle observée dans le groupe à faible risque (10,1 %) et nettement inférieure à celle du groupe à haut risque non traité (36,6 % ;  $p < 0,001$ ). IgIV, immunoglobuline intraveineuse.

Des chiffres similaires sur l'incidence de la néphropathie à BKPyV ont été observés à un an post-transplantation (4,5 % [2 cas] dans le groupe à haut risque traité par IgIV, 2,2 % [2 cas]

dans le groupe à faible risque et 19,5 % [8 cas] chez les patients à haut risque non traités ;  $p = 0,001$  ; figure 21).

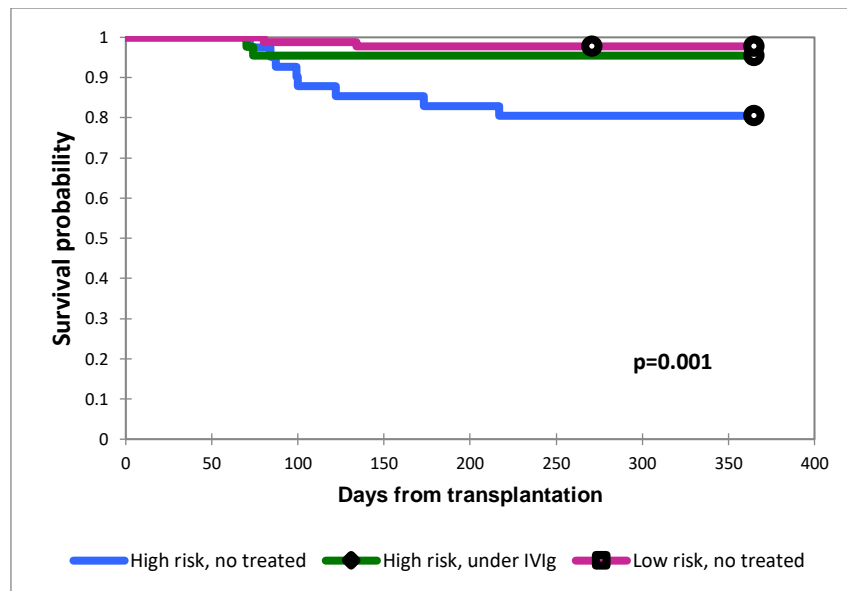


Figure 21. Courbes de Kaplan-Meier de la survie sans néphropathie à BKPyV

À 12 mois post-transplantation, l'incidence de la néphropathie à BKPyV dans le groupe à haut risque traité par IgIV (4,5 %) était similaire à celle observée dans le groupe à faible risque (2,2 %) et nettement inférieure à celle du groupe à haut risque non traité (19,5 % ;  $p = 0,001$ ). NAb : anticorps neutralisants.






## D. Discussion

Dans notre étude, les IgIV ont augmenté les titres de NAb contre le génotype I du BKPyV (c'est-à-dire le génotype largement prédominant) au-delà du seuil de protection de  $4 \log_{10} IC_{50}$ . De plus, l'immunisation passive avec des IgIV administrés en post-greffe immédiat était associée à une incidence significativement plus faible de la virémie BKPyV et de la néphropathie à BKPyV chez les transplantés à haut risque. Au total, 85 patients ont été identifiés comme étant à haut risque de réplication du BKPyV (sur la base de la présence d'un titre NAb  $<4 \log_{10} IC_{50}$  le jour de la greffe). À 12 mois après la greffe, l'incidence de la virémie dans le groupe à haut risque traité par IgIV (6,8 %) était similaire à celle observée dans le groupe à faible risque (10,1 %) et nettement inférieure à celle du groupe à haut risque non traité (36,6 %). Deux des 3 patients à haut risque traités par IgIV qui présentaient des virémies BKPyV n'ont pas pu atteindre le seuil protecteur de  $4 \log_{10} IC_{50}$ . De plus, les donneurs correspondants présentaient des titres de NAb élevés (5,74 et 5,38  $\log_{10} IC_{50}$ , respectivement, contre une moyenne chez les autres donneurs de 4,31 [0,78]  $\log_{10} IC_{50}$ ). En effet, une séroréactivité élevée du donneur représente également un facteur de risque de réplication du BKPyV, en particulier chez les receveurs avec de faibles titres de NAb.<sup>127-129</sup> L'incidence de la néphropathie à BKPyV était faible dans le groupe à haut risque traité par IgIV (4,5 %). Ces chiffres sont similaires à ceux observés dans le groupe à faible risque (2,2 %) et nettement inférieurs à ceux des patients à haut risque non traités (19,5 %). Nos résultats actuels apportent un argument supplémentaire en faveur de l'importance des anticorps neutralisant le BKPyV et l'immunité B dans la prévention de la réplication du BKPyV. Dans une étude *in vitro*, Randhawa *et al*<sup>269</sup> ont rapporté que les IgIV sont capables d'inhiber la réplication du BKPyV. L'effet inhibiteur était plus prononcé lorsque les immunoglobulines étaient co-incubées avec des virions BKPyV avant l'infection cellulaire expérimentale par rapport à leur utilisation pendant la phase d'infection.

Ces résultats *in vitro* suggèrent que les IgIV pourraient être plus utiles en tant que traitement préventif plutôt que curatif, alors que l'immunité des lymphocytes T est préférentiellement impliquée dans le contrôle de la réplication active du BKPyV.<sup>161,228,270</sup> Les effets modulateurs potentiels des IgIVs ne peuvent pas être exclus et n'ont pas été étudiés dans notre travail.

La méthodologie, les résultats et la discussion de l'étude sont détaillés dans la publication ci-dessous.

# Intravenous immunoglobulin as a preventive strategy against BK virus viremia and BKV-associated nephropathy in kidney transplant recipients—Results from a proof-of-concept study

Ilies Benotmane<sup>1,2,3</sup>  | Morgane Solis<sup>2,3</sup> | Aurélie Velay<sup>2,3</sup> | Noëlle Cognard<sup>1,3</sup>  | Jérôme Olagne<sup>1,3,4</sup> | Gabriela Gautier Vargas<sup>1,3</sup>  | Peggy Perrin<sup>1,3</sup> | David Marx<sup>1,3</sup>  | Eric Soulier<sup>3</sup> | Floriane Gallais<sup>2,3</sup> | Bruno Moulin<sup>1,3</sup> | Samira Fafi-Kremer<sup>2,3</sup>  | Sophie Caillard<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Service de Néphrologie et Transplantation, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Virologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>3</sup>Inserm UMR S1109, LabEx Transplantex, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>4</sup>Service de Pathologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

## Correspondence

Sophie Caillard  
Email: sophie.caillard@chru-strasbourg.fr

## Funding information

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (UMR\_S 1109), Grant/Award Number: UMR\_S 1109; Laboratoire d'Excellence TRANSPLANTEX (ANR-11-LABX-0070\_TRANSPLANTEX); Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (Recherche Non-Interventionnelle [RNI] 2016 – N° 6368); Agence Nationale de la Recherche (ANR): ANR HuMABK N° R19038MM

BK virus (BKV) replication occurs frequently in kidney transplant recipients (KTR), potentially leading to BKV-associated nephropathy (BKVAN) and graft loss. Patients with high titers of BKV-neutralizing antibodies (NABs) are protected against BKV replication, and intravenous immunoglobulin (IVIg) infusion can increase NAb titers. We investigated whether early IVIg administration prevents BKV replication in patients with low NAb titers ( $<4 \log_{10}$  against the BKV-specific genotype). Based on NAb titers on the day of transplantation, KTR followed in the Strasbourg University Hospital ( $n = 174$ ) were retrospectively divided into the following 3 risk categories for BKV replication: (1) patients with low NAb titers ("high-risk") who received IVIg for the first 3 posttransplant months ( $n = 44$ ), (2) patients with low NAb titers ("high-risk") who did not undergo IVIg treatment ( $n = 41$ ), and (3) patients with high NAb titers ("low-risk") who did not receive IVIg ( $n = 89$ ). At 12 posttransplant months, the incidence of BKV viremia in the high-risk group treated with IVIg (6.8%) was similar to that observed in the low-risk group (10.1%) and markedly lower than that of the untreated high-risk group (36.6%;  $P < .001$ ). Similar results were observed with regard to BKVAN. We conclude that IVIg may be a valuable strategy for preventing BKV replication.

## KEYWORDS

antibiotic: antiviral, clinical research/practice, complication: infectious, infection and infectious agents – viral: BK/JC/polyoma, infectious disease, kidney transplantation/nephrology

**Abbreviations:** AMR, antibody-mediated rejection; AUC, area under the concentration-time curve; BKV, BK virus; BKVAN, BKV-associated nephropathy; Day 0, day of transplantation; DSA, donor-specific antibodies; IgG, immunoglobulin G; IVIg, intravenous immunoglobulin; KT, kidney transplantation; KTR, kidney transplant recipients; MMF, mycophenolate mofetil; mTOR, mammalian target of rapamycin; NAB, neutralizing antibodies; PRA, panel reactive antibody; SD, standard deviation; SID, secondary immunodeficiency.

[Correction added on 4 December, 2020, after first online publication: In the abstract, "from developing" has been removed in the sentence: "We investigated whether early IVIg administration prevents BKV replication in patients with low NAb titers ( $<4 \log_{10}$  against the BKV-specific genotype); The word "intravenous immunoglobulins" has been corrected to "intravenous immunoglobulin" in all occurrence]

## 1 | INTRODUCTION

BK virus (BKV) infections are still a major concern following kidney transplantation (KT), with BKV replication occurring in 30%-50% of all kidney transplant recipients (KTR). BKV-associated nephropathy (BKVAN) can affect up to 10% of BKV-infected KTR, potentially leading to kidney dysfunction and graft loss.<sup>1-3</sup>

No specific antiviral treatment is currently available against BKV infections.<sup>4-6</sup> Regular screening of BKV viremia or viruria accompanied by a reduction of immunosuppressive therapy remains the only viable strategy to control BKV replication.<sup>2,7,8</sup> Unfortunately, this approach proves successful only in 50%-80% of cases<sup>9</sup> and does not eliminate the potential evolution to BKVAN. Moreover, it is associated with an increased risk of developing donor-specific antibodies (DSA) and acute rejection.<sup>10-13</sup> In this scenario, novel strategies for preventing the deleterious effects of BKV are eagerly awaited.

Intravenous immunoglobulin (IVIg) administration has been empirically proposed as a preemptive and supportive treatment against BKV infections. However, the available studies in the field should be interpreted cautiously because of major methodological limitations – including small sample sizes, the lack of a control arm, and the concomitant use of other antiviral strategies and/or a parallel reduction of immunosuppression.<sup>14-19</sup>

Humoral immunity plays a crucial role for the prevention of BKV replication in KTR, with high titers of BKV-neutralizing antibodies (NAb) having a protective effect. We have previously shown that NAb titers against the donor's BKV strain lower than 4 log<sub>10</sub> IC50 at the time of transplantation (day 0) are associated with an increased risk of BKV replication following KT.<sup>20</sup> Conversely, IVIg can exert

a clinically relevant neutralizing activity against the most common BKV genotypes, with IVIg infusion resulting in increased NAb titers among KTR.<sup>21,22</sup>

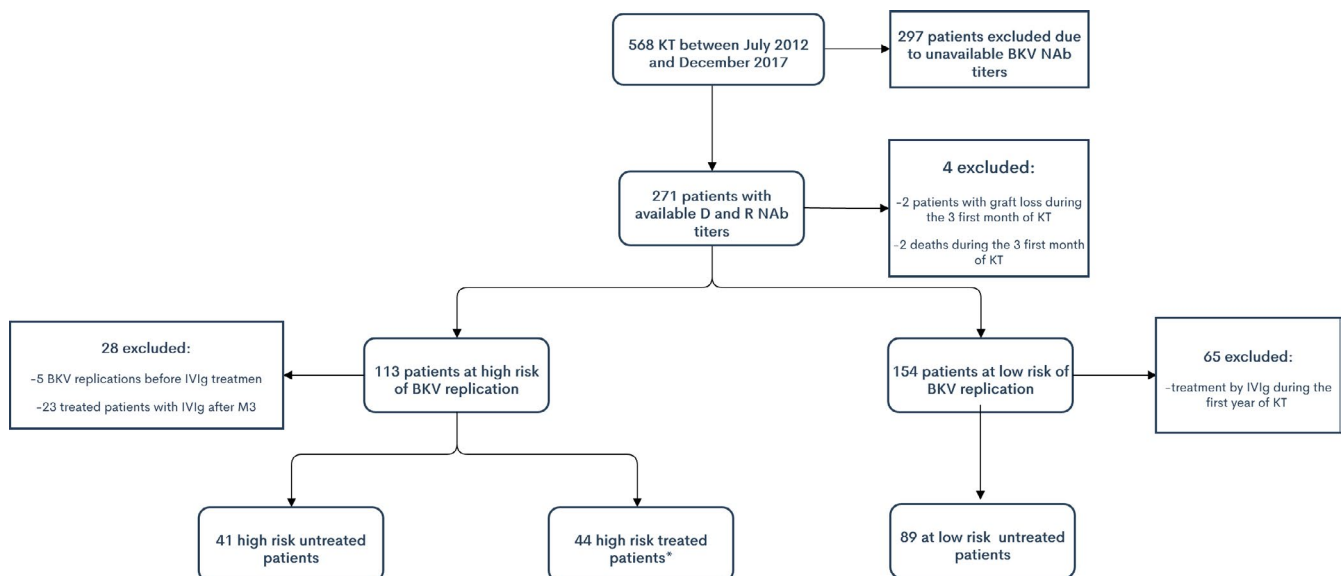
In this study, we sought to investigate whether the preventive administration of IVIg may reduce the incidence of BKV viremia and BKVAN in high-risk KTR. Risk stratification was based on NAb titers against the donor's BKV strain measured on day 0.

## 2 | PATIENTS AND METHODS

### 2.1 | Study patients

We retrospectively reviewed the clinical records of adult patients who underwent KT in the Strasbourg University Hospital between July 2012 and December 2017. All cases with available NAb titers measured on day 0 were deemed eligible. Exclusion criteria were patient or graft survival lower than 3 months (Figure 1). In line with our previous methodology,<sup>20</sup> patients with NAb titers below 4 log<sub>10</sub> IC50 against the donor's strain (which was determined by measuring NAb titers in the donor's sera) were considered at high-risk. When the donor's specimen was unavailable, the replicating strain was considered as reference for patients showing an active BKV replication. This choice was motivated by the fact that replicating BKV in KTR is mainly of donor's origin.<sup>20</sup> The most common viral genotype (genotype I) was taken as reference for patients with a negative BKV DNA load.

Based on NAb titers on day 0 and the prescription of IVIg infusion, the study patients (n = 174) were divided into the following 3 risk categories for BKV replication: (1) patients with low NAb



**FIGURE 1** Flow of patients through the study. \*Forty-one of the 44 high-risk patients who received IVIg were treated with low IVIg doses (for secondary immune deficiency), whereas 3 with high IVIg doses (2 with curative intent for antibody-mediated rejection and 1 for the occurrence of de novo DSA without concurrent antibody-mediated rejection). BKV, BK virus; D, donor; IVIg, intravenous immunoglobulin; KT, kidney transplantation; NAb, BKV-neutralizing antibodies; R, recipient [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions)]

titers ("high-risk patients") who received IVIg treatment for secondary immunodeficiency (SID) or for prevention or treatment of antibody-mediated rejection (AMR) during the first 3 posttransplant months and before BKV replication ( $n = 44$ ), (2) patients with low NAb titers ("high-risk patients") who did not undergo IVIg treatment during the first year of KT ( $n = 41$ ), and (3) patients with high NAb titers ("low-risk patients") who did not receive IVIg ( $n = 89$ ). Secondary immunodeficiency was defined either as (1) IgG levels  $<400$  mg/dL or (2) IgG levels between 400 and 800 mg/dL in the presence of a concurrent infection. Low-risk patients who received IVIg during the first posttransplant year were not included in the study ( $n = 65$ ). Ethical approval was granted from the local institutional review board (DC-2013-1990), and all participants provided written informed consent.

## 2.2 | Immunosuppressive regimens

Immunosuppressive therapy after KT consisted of an induction therapy with basiliximab or thymoglobulin based on the recipient's immunological risk. Patients with a panel reactive antibody (PRA)  $>20\%$  and a history of ABO-incompatible kidney transplantation were treated by thymoglobulin. In the subsequent maintenance phase, the patient received a calcineurin inhibitor (cyclosporin or tacrolimus) in association with mycophenolate mofetil (MMF) or a mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor (everolimus) and steroids. Target trough levels of tacrolimus were 10-12 ng/mL during the first 3 months, 8-10 ng/mL from month 4 to month 6, and 6-8 ng/mL from month 6 to month 12. Target trough levels of cyclosporin were 150-200 ng/mL during the first 6 months and 125-150 ng/mL from month 6 to month 12. The target for the mycophenolic acid area under the concentration-time curve (AUC) from 0 to 12 hours at months 1 and 3 was 30-60 mg·h·L. Target trough levels of everolimus were 3-8 ng/mL. All patients received 2 steroid pulses at a dose of 250 mg followed by 1 mg/kg/day oral steroids that were progressively tapered during the first 4 posttransplant months. Steroid administration at a dose of 0.1 mg/kg/day was continued in patients at high immunological risk or in those with a history of acute rejection.

## 2.3 | Monitoring of BKV infections

Blood samples for assessing BKV viremia were collected at the following time points: day 0, every month in the first 6 posttransplant months, and every 3 months thereafter (until 1 year following KT). Measurements were performed using a BKV quantitative real-time polymerase chain reaction kit (BK Virus R-Gene kit, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) with a 95% limit of detection of  $2.4 \log_{10}$  copies per mL. Allograft biopsies were performed in case of graft dysfunction, detection of DSA, or sustained BKV viremia (defined by the presence of  $4 \log_{10}$  copies per mL in 2 subsequent blood specimens). As of January 1, 2013, biopsies were performed systematically during the third posttransplant month. BKVAN was diagnosed and

classified according to the severity of virus-induced cytopathic effects, inflammatory infiltrates, tubular atrophy, fibrosis, and through immunohistochemistry using antibodies that cross-reacted against the large T antigen of the related simian polyomavirus (SV40 antibody; Calbiochem, San Diego, CA). BKV genotyping was performed in all BKV DNA-positive recipients as previously described.<sup>23</sup>

## 2.4 | Neutralization assay

NAb titers were measured at day 0; at the third, sixth, and 12th posttransplant months; and at the onset of viremia. Additional measurements at the first and second posttransplant months were performed in patients who received IVIg infusions. In accordance with a previously described methodology,<sup>20</sup> the neutralization assays were conducted using a BKV pseudovirion system that expressed the capsid proteins of BKV genotypes I, II, or IV. This assay allows quantifying titers of antibodies that functionally neutralize the infectivity of different BKV genotypes (each of which is a distinct neutralization serotype). The neutralization titer—which was defined as the sample dilution that resulted in a 50% inhibition of pseudovirion infectivity (IC50) – was expressed as  $\log_{10}$  of IC50. Sera were considered non-neutralizing when a 1:100 dilution ( $2.0 \log_{10}$ ) did not produce a  $>50\%$  reduction of the luminometric signal with respect to control conditions (ie, without serum or in presence of a negative control that induced a 50% neutralization of the reporter vector). A neutralization titer of  $2.5 \log_{10}$  IC50 was set as the threshold for quantification of antibody-mediated neutralization.

## 2.5 | IVIg therapy

Patients received the following commercial IVIg preparations: Privigen<sup>®</sup>, 100 mg/mL (CSL Behring GmbH, Marburg, Germany); Octagam<sup>®</sup>, 100 mg/mL (Octapharma, Langenfeld, Germany); Clairgy<sup>®</sup>, 50 mg/mL (LFB-Biomédicaments, Courtaboeuf, France); and Kiovig<sup>®</sup>, 100 mg/mL (Baxter, Deerfield, IL). IVIg were infused either as a preventive or curative treatment of AMR or in patients diagnosed with SID. Patients received 0.4 g/kg IVIg doses every 3 weeks – with a total number of doses ranging from 1 to 3 – according to their IgG levels. Patients with de novo DSA, preformed DSA, or biopsy-proven AMR were treated with three 2 g/kg doses of IVIg every 3 weeks.

## 2.6 | Data analysis

Continuous variables are presented as means (standard deviations [SDs]) or medians and interquartile ranges (25th–75th percentiles). Categorical variables are given as counts and percentages. Three-group comparisons of continuous variables were performed using the Kruskal-Wallis test. Categorical variables were analyzed with the chi-square test or the Fisher's exact test, as appropriate. The Kaplan-Meier method (log-rank test) was used to plot BKV



viremia-free survival (using the day of first viremia as the date of index event) and BKVAN-free survival (using the day of graft biopsy as the date of index event). A multivariable Cox regression analysis was performed to identify independent predictors of BKV viremia. The following covariates were entered in the model: age ( $\leq 55$  years vs  $> 55$  years), kidney transplantation rank (1 vs  $> 1$ ), treatment by antithymocyte globulin (vs basiliximab), treatment by everolimus (vs MMF), recipients NAb titers before transplantation ( $\leq 4 \log_{10}$  IC50 vs  $> 4 \log_{10}$  IC50), and patient groups (low-risk untreated, high-risk treated, and high-risk untreated).

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Patient characteristics

Figure 1 depicts the flow of patients ( $n = 174$ ) through the study. Donor BKV NAb titers or genotypes of replicating BKV were available for 133 cases (76.4%). Table 1 summarizes the general characteristics of the study participants.

At day 0, 170 (97.7%) recipients and 120 (96.7%) donors were seropositive for at least 1 BKV genotype. BKV genotype I—alone or

**TABLE 1** General characteristics of kidney transplant recipients ( $n = 174$ ) stratified according to NAb titers at the day of transplantation and the infusion of intravenous immunoglobulin

	High-risk, untreated (n = 41)	High-risk, treated with IVIg (n = 44)	Low-risk, untreated (n = 89)	P
Age, years, median (25th-75th percentiles)	58.6 (50.2-64.4)	56.5 (48.4-66.3)	50.8 (39.3-62.1)	.06
Men, n (%)	30 (73.1)	31 (70.5)	57 (64.0)	.53
First kidney transplantation, n (%)	32 (78.0)	41 (93.2)	71 (79.8)	.10
Living donor, n (%)	9 (22.0)	10 (22.7)	22 (24.7)	.98
ABO-incompatible, n (%)	1 (2.4)	3 (6.8)	1 (1.1)	.18
Cold ischemia time, min, median (25th-75th percentiles)	802 (383-1020)	841 (495-976.25)	678 (180-950)	.44
HLA class I and II mismatch, median (25th-75th percentiles)	4 (3-5)	4 (3-5)	4 (3-5)	.70
HLA sensitization, n (%)	12 (29.3)	10 (22.7)	31 (34.8)	.35
Desensitization	0	0	0	1
Ureteral stenting, n (%)	41 (100)	44 (100)	89 (100)	1
Induction therapy				
ATG, n (%)	24 (58.5)	21 (47.7)	36 (40.4)	.16
Basiliximab, n (%)	17 (41.7)	23 (52.3)	53 (59.6)	.16
Rituximab, n (%)	2 (4.9)	3 (6.9)	2 (2.3)	.46
Maintenance therapy at D0				
Tacrolimus, n (%)	22 (53.7)	23 (52.3)	46 (51.7)	.98
Ciclosporin, n (%)	18 (43.9)	21 (47.7)	43 (48.3)	.89
MMF, n (%)	41 (100)	39 (88.6)	88 (98.9)	.01
Everolimus, n (%)	0	5 (11.36)	1 (1.05)	.01
Steroids, n (%)	60 (97.6)	44 (100)	88 (98.9)	.48
Donor NAb and/or replicative strain available, n (%)	29 (70.7)	39 (88.6)	65 (73.0)	.08
Donor NAb at D0, median on $\log_{10}$ IC50 (25th-75th percentiles)	4.6 (3.9-5.2)	4.3 (3.8-4.7)	4.7 (4.1-5.3)	0.20
Recipient NAb at D0, median on $\log_{10}$ IC50 (25th-75th percentiles)	3.07 (2.32-3.63)	3.15 (2.64-3.55)	4.69 (4.34-5.09)	<.001
Donor/recipient BKV genotype mismatch, n (%)	14/20 (70)	27/38 (71)	0/62	<.001
Outcome				
Early rejection (within the first 3 posttransplant months), n (%)	3 (7.3)	7 (15.9)	9 (10.1)	.45
Creatininemia at M12, median, $\mu\text{mol/L}$ (25th-75th percentiles)	123.0 (106.0-149.1)	126.7 (114.8-160.7)	125.1 (98.8-154.6)	.57
Graft loss at M12, n (%)	0	1 (2.3)	0	.49
Death at M12, n (%)	0	0	1 (1.1)	1

Abbreviations: ATG, antithymocyte globulin; D0, day of transplantation; IVIg, intravenous immunoglobulin; M12, 1 year from transplantation; MMF, mycophenolate mofetil; NAb, BKV-neutralizing antibodies.

in combination with other genotypes—was detected in 138 (79.3%) recipients and 100 (83.3%) donors, respectively. Fifty-three (30.5%) recipients and 22 (18.3%) donors were seropositive for BKV genotype II, whereas 22 (12.6%) recipients and 9 (7.5%) donors were seropositive for BKV genotype IV (Figure S1). Donor NAb titers at D0 did not differ significantly between the 3 patient groups.

### 3.2 | IVIg administration increases BKV NAb titers in KTR

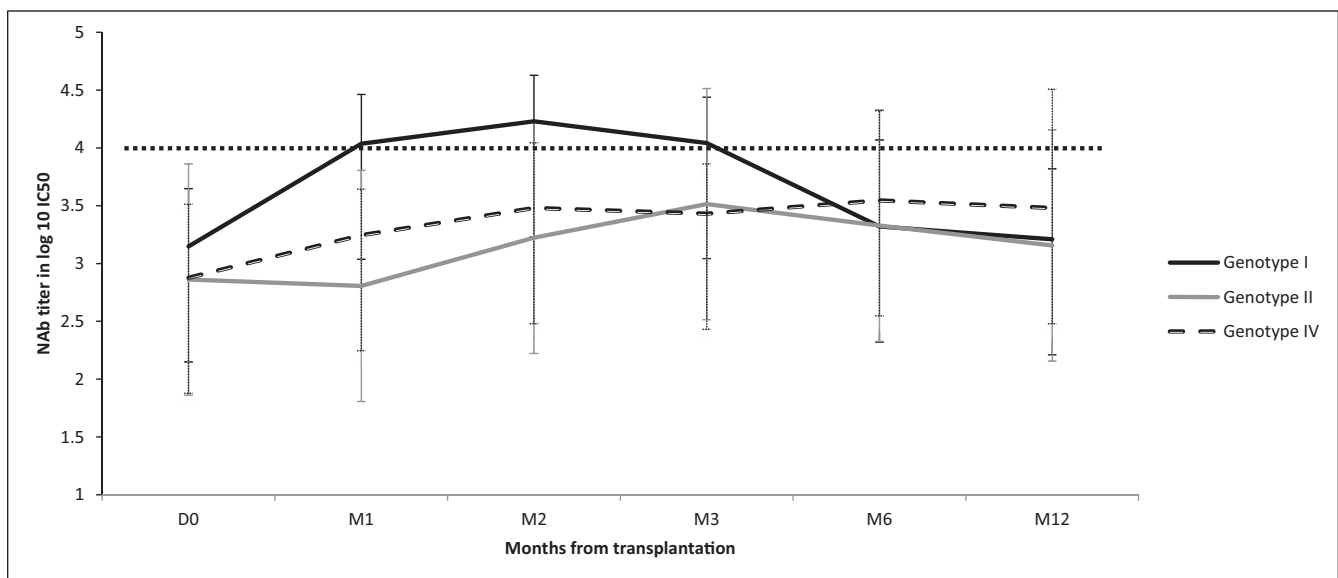
Among the 44 high-risk patients who were treated with IVIg, we identified 35 (79.5%), 7 (15.9%), and 2 (4.5%) cases in whom there was a high risk of replication for BKV genotype I, genotype II, and genotype IV, respectively. A total of 41 patients (93.2%) received IVIg infusion at a dose of 0.4 g/kg because of SID. Of them, 28 cases (63.6%) received 3 doses. The remaining 12 (27.3%) and 1 (2.3%) patients received 2 and 1 doses, respectively. Three (6.8%) patients received 3 IVIg infusions at a dose of 2 g/kg because of preventive or curative treatment of AMR, with IVIg being administered during the first 3 posttransplant months.

The temporal course of BKV NAb titers was studied only in patients who received IVIg in the absence of BKV viremia ( $n = 41$ , Figure 2). This approach allowed investigating the impact of IVIg when immune system stimulation was lacking (owing to the increased BKV NAb titers observed in KTR with BKV viremia). At day 0, the

mean BKV NAb titer was 3.06 (0.56)  $\log_{10}$  IC50. Before the first IVIg injection, BKV NAb titers remained below 4  $\log_{10}$  IC50 in all patients (mean: 3.07 [0.56]  $\log_{10}$  IC50). At 1 posttransplant month, when the majority of patients (93%) had already received the first IVIg injection, the mean NAb titers significantly increased to 3.82 (0.61)  $\log_{10}$  IC50 and remained at these levels for the subsequent 2 months ( $P < .001$ ). A decrease in NAb titers occurred afterwards, with a return to the initial levels between 6 and 12 posttransplant months.

Among these 41 patients, there was a high risk of replication for BKV genotype I, genotype II, and genotype IV in 32, 7, and 2 cases, respectively. Twenty-nine of the 32 patients (91%) at high risk for BKV genotype I replication were capable of reaching a BKV NAb titer above the threshold of 4  $\log_{10}$  IC50 in at least 1 occasion during the first 3 posttransplant months. The remaining 3 cases who were unable to achieve high NAb titers received 2 or 3 low-dose IVIg infusions. All of them showed markedly low titers before IVIg treatment (2.35  $\log_{10}$  IC50, 2.42  $\log_{10}$  IC50, and 2.71  $\log_{10}$  IC50, respectively) – which increased after IVIg administration to 3.76  $\log_{10}$  IC50, 3.89  $\log_{10}$  IC50, and 3.89  $\log_{10}$  IC50, respectively. Only 2 and 1 patients among those with a high risk of replication for BKV genotype II and genotype IV, respectively, were capable of obtaining a BKV NAb titer above the threshold of 4  $\log_{10}$  IC50 (Figure 2).

In the 26 high-risk patients without IVIg and no BKV viremia, there were no significant differences in BKV NAb titers measured on the day of transplantation and 1 year thereafter (3.1  $\log_{10}$  IC50 vs 3.2  $\log_{10}$  IC50, respectively,  $P = .20$ , Figure S2). Only 5 of these patients showed an increase of NAb titers  $>1.5 \log_{10}$  IC50. Testing of



**FIGURE 2** Temporal course of BKV NAb titers in kidney transplant recipients who received intravenous immunoglobulin. NAb titers are reported as means and standard deviations from the day of transplantation to the 12th posttransplant month. Only data from patients who did not show BKV viremia are presented. The assay used in the study measured the titers of BKV NAb directed against the donor's strain. When the donor's specimen was unavailable, the replicating strain was considered as reference for patients showing an active BKV replication. The most common viral genotype (genotype I) was taken as reference for patients with a negative BKV DNA load. The black, gray, and dotted curves depict the temporal course of mean NAb titers when the targeted strains had genotype I ( $n = 32$ ), II ( $n = 7$ ), and IV ( $n = 2$ ), respectively. The dotted line indicates the protective threshold against BKV replication (4  $\log_{10}$  IC50). IVIg administration significantly increased BKV NAb titers during the first 3 posttransplant months – although this effect was chiefly confined to NAb directed against genotype I and much less pronounced for NAb against genotypes II and IV. BKV, BK virus; NAb, BKV-neutralizing antibodies

BKV viremia was positive in 4 of these patients – potentially offering an explanation for this response.

### 3.3 | IVIg administration decreases the incidence of both BKV viremia and BKVAN in KTR

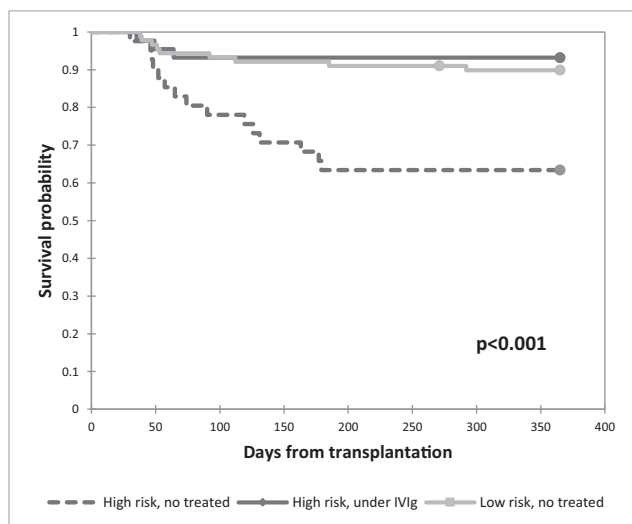
BKV viremia was observed in 27 of the 174 study patients (total incidence at 1 posttransplant year: 15.5%). In general, BKV viremia was an early event that occurred after a median of 64 days from KT (25th-75th percentiles: 47.5-128.5 days). The median peak viral load was  $4.91 \log_{10}$  copies per mL (25th-75th percentiles:  $4.68$ - $5.27 \log_{10}$  copies per mL). Six (22.2%) patients had a viremia duration shorter than 90 days. BK genotype I and IV were identified as the replicating strains in 23 (85%) and 4 (15%) patients, respectively, whereas no case showed genotype II replication. Of the 120 donor/recipient pairs with available data, 41 had a BKV genotype mismatch. The frequency of viremia was higher in presence of donor/recipient BKV genotype mismatch (17.1% vs 8.9%, respectively,  $P = .23$ ), albeit not significantly so. The management of immunosuppression after the occurrence of BK viremia is depicted in Table S1. Despite immunosuppressive reduction, 12 patients evolved to a biopsy-proven BKVAN (total incidence at 1 posttransplant year: 6.9%) – which occurred after a median of 93 days from KT (25th-75th percentiles: 78.5-125 days). The median peak viral load was higher in the subset of patients with viremia who developed BKVAN compared with

those who did not ( $5.29 \log_{10}$  copies per mL vs  $4.88 \log_{10}$  copies per mL, respectively,  $P = .04$ ).

At 12 posttransplant months, the incidence of BKV viremia in the high-risk group treated with IVIg (6.8%, 3 of 44 patients) was similar to that observed in the low-risk group (10.1%, 9 of 88 patients) and markedly lower than that of the untreated high-risk group (36.6%; 15 of 41 patients;  $P < .001$ ; Figure 3). The 3 high-risk patients treated with IVIg who had evidence of BKV viremia underwent longitudinal analyses of BKV DNA loads and BKV NAb titers. The results revealed that 2 of them were unable to achieve the protective threshold of  $4 \log_{10}$  IC50 before the first viremia episode.

The median peak viral load was significantly lower in the high-risk group treated with IVIg ( $4.16 \log_{10}$  copies/mL) compared with the low-risk group ( $5.03 \log_{10}$  copies/mL) and the untreated high-risk group ( $4.97 \log_{10}$  copies/mL,  $P = .025$ ; Table 2). Patients who received IVIg were more frequently treated with everolimus than those who did not. Conversely, the use of MMF was less common in the former group (Table 1). Notably, multivariate analysis did not reveal significant associations between immunosuppressive therapies and the incidence of BKV viremia (Table 3). The occurrence of BK viremia was independently associated with D0 NAb titers and patient group in multivariate analysis. Patients in the high-risk untreated group had a 24-fold increase in the risk of developing BK viremia compared with the low-risk group (Table 3).

Similar figures were observed with regard to the incidence of BKVAN at 12 posttransplant months (4.5% [2 cases] in the high-risk group treated with IVIg, 2.2% [2 cases] in the low-risk group, and 19.5% [8 cases] in untreated high-risk patients;  $P = .001$ ; Figure 4).



**FIGURE 3** Kaplan-Meier plots of BKV viremia-free survival in high-risk patients who did not undergo IVIg treatment (dotted curve), high-risk patients who received IVIg for the first 3 posttransplant months (black curve), and low-risk patients who did not receive IVIg (gray curve). At 12 posttransplant months, the incidence of BKV viremia in the high-risk group treated with IVIg (6.8%) was similar to that observed in the low-risk group (10.1%) and markedly lower than that of the untreated high-risk group (36.6%;  $P < .001$ ). BKV, BK virus; IVIg, intravenous immunoglobulin; KT, kidney transplantation

## 4 | DISCUSSION

There are 2 principal findings from this study. First, IVIg were found to increase NAb titers against BKV genotype I (ie, the largely predominant genotype) over the protective threshold of  $4 \log_{10}$  IC50. Second, passive immunization with IVIg in the early posttransplant phase was associated with a significantly lower incidence of both BKV viremia and BKVAN in high-risk KTR.

We have previously shown that the anti-BKV antibody-mediated neutralizing response in KTR plays a key role in the protection against BKV replication.<sup>20</sup> We also demonstrated that NAb titers against the donor's strain measured before KT are clinically useful for risk stratification of BKV-related disease. In the current study, 85 patients were identified as being at high-risk for BKV replication (based on the presence of a NAb titer  $< 4 \log_{10}$  IC50 at day 0). Because IVIg preparations contain high levels of BKV NABs, we sought to assess whether among these patients, those receiving IVIg for SID or AMR early after KT may be protected against BKV replication.<sup>21,22</sup> In the high-risk treated group, only 3 cases received high-dose IVIg. These patients were not excluded from the analysis for the following reasons: (1) we have previously shown that BKV NAB titers against genotype I increased in a similar fashion after low or high IVIg doses<sup>22</sup> (2) despite a higher burden of immunosuppression

**TABLE 2** Characteristics of patients with BKV viremia and/or BKV-associated nephropathy according to NAb titers at the day of transplantation and the infusion of intravenous immunoglobulin

	High-risk, untreated (n = 15)	High-risk, treated with IVIg (n = 3)	Low-risk, untreated (n = 9)	P
Incidence of BKV viremia at M12 of transplantation, n (%)	15 (36.6)	3 (6.8)	9 (10.1)	<.001
Time to onset (d)	74 (50-136.5)	49 (42-56.5)	53 (47-112)	.37
Peak viral load (log <sub>10</sub> per mL)	4.97 (4.86-5.58)	4.16 (4.07-4.33)	5.03 (4.72-5.15)	.025
Viremia shorter than 90, n (%)	3 (20)	0	3 (33.3)	.62
Incidence of BKVAN at M12 of transplantation, n (%)	8 (19.5)	2 (4.5)	2 (2.2)	.001
BKVAN stage, n (%)				.91
A	5 (62.5)	1 (50.0)	1 (50.0)	
B	3 (36.5)	1 (50.0)	1 (50.0)	
C	0	0	0	

Abbreviations: BKV, BK virus; BKVAN, BKV-associated nephropathy; M12, month 12.

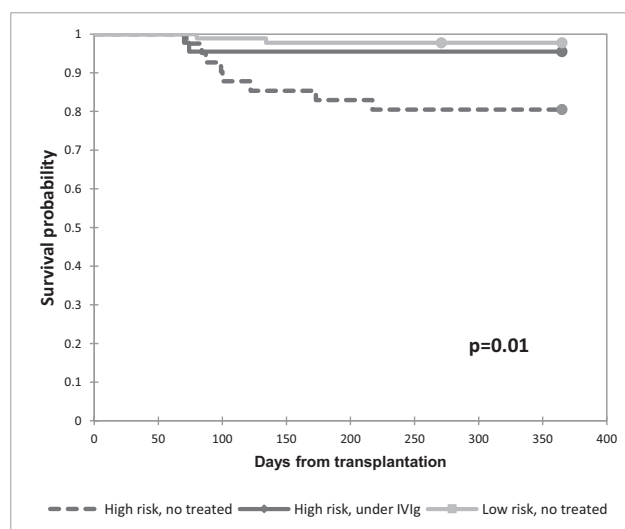
**TABLE 3** Multivariate analysis of risk factors associated with the occurrence of BKV viremia in 174 kidney transplant recipients

	Odds ratio	95% confidence interval	P
Age (≤55 vs >55 y)	1.2	0.5-2.8	.6
Transplantation rank (1 vs >1)	1.6	0.6-4.1	.37
ATG (vs basiliximab)	1.0	0.4- 2.5	.93
Everolimus (vs MMF)	0.4	0.04-4.2	.47
Patients groups			
Low-risk, untreated	1 (ref)		
High-risk, treated with IVIg	4.2	0.5-34.1	.18
High-risk, untreated	24.8	4.4-140.3	<.001
Recipient NAb levels at D0 (≤4 vs >4 <sup>a</sup> )	6.5	1.3-33.1	.02

Abbreviations: ATG, antithymocyte globulin; BKV, BK virus; D0, day of transplantation; MMF, mycophenolate mofetil; NAb, BKV-neutralizing antibodies.

<sup>a</sup>log<sub>10</sub> IC50.

caused by AMR and DSA treatment, the 3 patients did not have evidence of BKV replication after IVIg infusion (ultimately supporting the potential utility of IVIg for preventing BKV replication); and (3) the rate of early AMR did not show significant intergroup differences. We examined the preventive role of IVIg in the first 3 post-transplant months because BKV replication generally occurs early following KT.<sup>2,24,25</sup> At 12 posttransplant months, the incidence of BKV viremia in the high-risk group treated with IVIg (6.8%) was similar to that observed in the low-risk group (10.1%) and markedly lower than that of the untreated high-risk group (36.6%). Two of the 3 high-risk patients treated with IVIg who had evidence of BKV viremia were unable to achieve the protective threshold of 4 log<sub>10</sub> IC50. Moreover, the corresponding donors showed high BKV NAb titers

**FIGURE 4** Kaplan-Meier plots of BKV-associated nephropathy-free survival in high-risk patients who did not undergo IVIg treatment (dotted curve), high-risk patients who received IVIg for the first 3 posttransplant months (black curve), and low-risk patients who did not receive IVIg (gray curve). At 12 posttransplant months, the incidence of BKV-associated nephropathy in the high-risk group treated with IVIg (4.5%) was similar to that observed in the low-risk group (2.2%) and markedly lower than that of the untreated high-risk group (19.5%;  $P = .001$ ). BKV, BK virus; NAb, BKV-neutralizing antibodies

(5.74 and 5.38 log<sub>10</sub> IC50, respectively, vs a mean in other donors of 4.31 [0.78] log<sub>10</sub> IC50). Notably, a high donor seroreactivity can act as a risk factor for BKV replication especially in recipients with low BKV NAb titers.<sup>20,24</sup> Although the donor's serotype was unavailable for the third patient, the recipient had a NAb titer of 4.69 log<sub>10</sub> IC50 at the date of first BKV viremia. The unavailability of urine samples does not allow excluding that BKV replication may have occurred before IVIg infusion. Another important finding from our study is

that the incidence of BKVAN was as low as 4.5% in the high-risk group treated with IVIg. Such figures are similar to those observed in the low-risk group (2.2%) and markedly lower than those of untreated high-risk patients (19.5%). For the sake of clarity, low-risk patients who received IVIg were not included in the current analysis. The incidence of BKV viremia (12.5% vs 10.1%, respectively,  $P = .66$ ) and BKVAN (6.3% vs 2.2%, respectively,  $P = .48$ ) was similar to that observed in low-risk untreated patients.

Our current results add to the growing amount of evidence showing that BKV-neutralizing antibodies and B cell immunity play a key role in the prevention of BKV replication. Conversely, T cell immunity is preferentially involved in the control of active BKV replication.<sup>20,24,26-28</sup> Although this was a retrospective nonrandomized study, there were no major intergroup differences at baseline – the only exception being the use of everolimus (which was more frequent for patients who received IVIg). It has been previously shown that mTOR inhibitors may be protective against BKV replication,<sup>29</sup> no firm conclusions can be drawn from our study owing to the small number of patients treated with everolimus ( $n = 6$ ).

In an *in vitro* study, Randhawa et al<sup>30</sup> reported that human immunoglobulin are capable of inhibiting BKV replication. Notably, the inhibitory effect was more pronounced when immunoglobulins were coincubated with BKV virions before experimental cell infection compared with their use in the postinfection phase. Altogether, these *in vitro* results suggested that IVIg may be more useful as a preventive – rather than curative – strategy. As far as published clinical studies are concerned, the potential utility of IVIg administration in the management of BKV replication is still debatable owing to the concomitant use of other antiviral strategies and/or immunosuppression tapering. In addition, IVIg have been previously administered with curative intent or even as a rescue treatment.<sup>14-19</sup> To our knowledge, the current study is the first to demonstrate that IVIg infusion may be a valuable strategy for preventing BKV replication in KTR.

Our research has some strengths – including an accurate risk stratification for BKV replication based on the quantification of NAb titers against the 3 most common BKV genotypes and a high availability of donors' samples. However, our study is limited by its retrospective design, the relatively small number of patients who received IVIg infusions, and the use of different IVIg doses and administration schedule. These caveats notwithstanding, we provide proof-of-concept evidence that IVIg administration is capable of preventing BKV viremia and BKVAN in KTR with low NAb titers. A multicenter controlled randomized study (NCT 04222023) will start shortly in France to confirm these findings.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Christopher B. Buck for providing expression plasmids for VP1, VP2, and VP3 and the National Cancer Institute Tumor Repository for 293TT cells. This work was supported by grants from the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (Recherche Non-Interventionnelle [RNI] 2016 – N° 6368), the Agence Nationale de la Recherche (ANR): ANR HuMABK N° R19038MM,

Laboratoire d'Excellence TRANSPLANTE (ANR-11-LABX-0070\_TRANSPLANTE), and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (UMR\_S 1109).

## DISCLOSURE

The authors of this manuscript have no conflict of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## ORCID

Ilies Benotmane  <https://orcid.org/0000-0001-9113-2479>

Noëlle Cognard  <https://orcid.org/0000-0001-6602-2059>

Gabriela Gautier Vargas  <https://orcid.org/0000-0001-9377-1055>

David Marx  <https://orcid.org/0000-0002-5804-671X>

Samira Fafi-Kremer  <https://orcid.org/0000-0003-3886-7833>

## REFERENCES

- Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med*. 2002;347(7):488-496.
- Brennan DC, Agha I, Bohl DL, et al. Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *Am J Transplant*. 2005;5(3):582-594.
- Borni-Duval C, Caillard S, Olgne J, et al. Risk factors for BK virus infection in the era of therapeutic drug monitoring. *Transplantation*. 2013;95(12):1498-1505.
- Knoll GA, Humar A, Fergusson D, et al. Levofloxacin for BK virus prophylaxis following kidney transplantation: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2014;312(20):2106-2114.
- Krisl JC, Taber DJ, Pilch N, et al. Leflunomide efficacy and pharmacodynamics for the treatment of BK viral infection. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012;7(6):1003-1009.
- Pallet N, Burgard M, Quamouss O, et al. Cidofovir may be deleterious in BK virus-associated nephropathy. *Transplantation*. 2010;89(12):1542-1544.
- Petrov R, Elbahloul O, Gallichio MH, Stellrecht K, Conti DJ. Monthly screening for polyoma virus eliminates BK nephropathy and preserves renal function. *Surg Infect*. 2009;10(1):85-90.
- Bischof N, Hirsch HH, Wehmeier C, et al. Reducing calcineurin inhibitor first for treating BK polyomavirus replication after kidney transplantation: long-term outcomes. *Nephrol Dial Transplant*. 2019;34(7):1240-1250.
- Johnston O, Jaswal D, Gill JS, Doucette S, Fergusson DA, Knoll GA. Treatment of polyomavirus infection in kidney transplant recipients: a systematic review. *Transplantation*. 2010;89(9):1057-1070.
- Parajuli S, Astor BC, Kaufman D, et al. Which is more nephrotoxic for kidney transplants: BK nephropathy or rejection? *Clin Transplant*. 2018;32(4):e13216.
- Hardinger K, Koch M, Bohl D, Storch G, Brennan D. BK-virus and the impact of preemptive immunosuppression reduction: 5-year results. *Am J Transplant*. 2010;10(2):407-415.
- Cheungpasitporn W, Kremers WK, Lorenz E, et al. De novo donor-specific antibody following BK nephropathy: the incidence and association with antibody-mediated rejection. *Clin Transplant*. 2018;32(3):e13194.
- Devresse A, Tinel C, Vermorel A, et al. No clinical benefit of rapid versus gradual tapering of immunosuppression to treat sustained

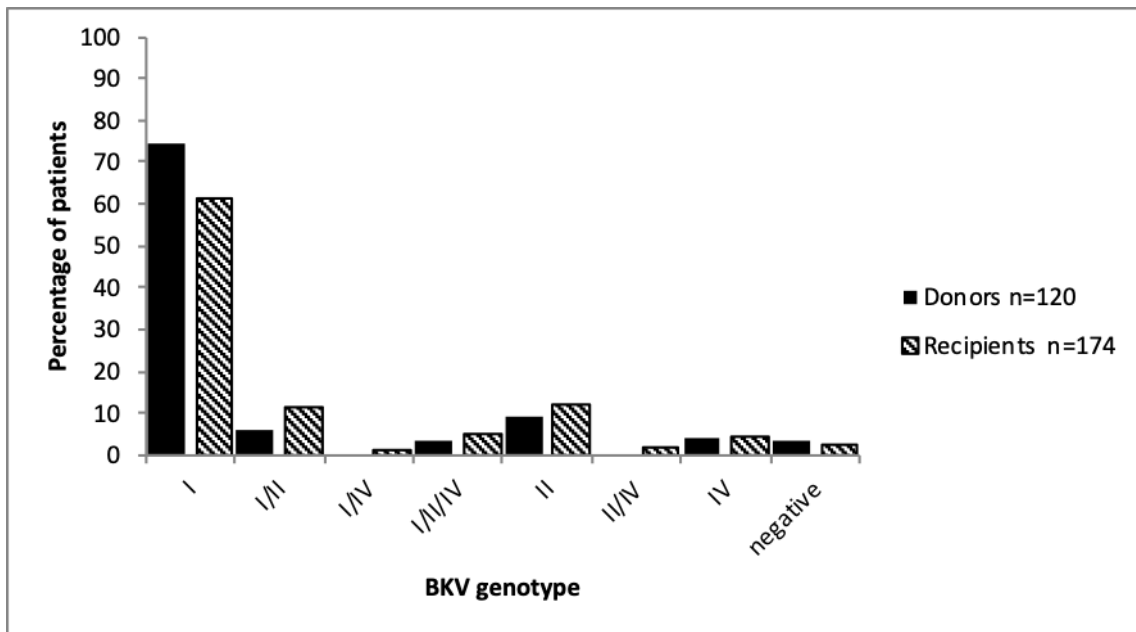


- BK virus viremia after kidney transplantation: a single-center experience. *Transpl Int*. 2019;32(5):481-492.
14. Vu D, Shah T, Ansari J, Naraghi R, Min D. Efficacy of intravenous immunoglobulin in the treatment of persistent BK viremia and BK virus nephropathy in renal transplant recipients. *Transplant Proc*. 2015;47(2):394-398.
  15. Anyaegbu EI, Almond PS, Milligan T, Allen WR, Gharaybeh S, Al-Akash SI. Intravenous immunoglobulin therapy in the treatment of BK viremia and nephropathy in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Transplant*. 2012;16(1):E19-E24.
  16. Kable K, Davies CD, O'Connell PJ, Chapman JR, Nankivell BJ. Clearance of BK virus nephropathy by combination antiviral therapy with intravenous immunoglobulin. *Transplant Direct*. 2017;3(4):e142.
  17. Sener A, House AA, Jevnikar AM, et al. Intravenous immunoglobulin as a treatment for BK virus associated nephropathy: one-year follow-up of renal allograft recipients. *Transplantation*. 2006;81(1):117-120.
  18. Sharma AP, Moussa M, Casier S, Rehman F, Filler G, Grimmer J. Intravenous immunoglobulin as rescue therapy for BK virus nephropathy. *Pediatr Transplant*. 2009;13(1):123-129.
  19. Hwang SD, Lee JH, Lee SW, Kim JK, Kim M-J, Song JH. High-dose intravenous immunoglobulin treatment of polyomavirus nephropathy developing after T cell-mediated rejection treatment: a case report. *Transplant Proc*. 2018;50(8):2575-2578.
  20. Solis M, Velay A, Porcher R, et al. Neutralizing antibody-mediated response and risk of BK virus-associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(1):326-334.
  21. Randhawa P, Pastrana DV, Zeng G, et al. Commercially available immunoglobulins contain virus neutralizing antibodies against all major genotypes of polyomavirus BK. *Am J Transplant*. 2015;15(4):1014-1020.
  22. Velay A, Solis M, Benotmane I, et al. Intravenous immunoglobulin administration significantly increases BKPyV genotype-specific neutralizing antibody titers in kidney transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(8):e00393-19.
  23. Solis M, Meddeb M, Sueur C, et al. Sequence variation in amplification target genes and standards influences interlaboratory comparison of BK virus DNA load measurement. *J Clin Microbiol*. 2015;53(12):3842-3852.
  24. Wunderink HF, van der Meijden E, van der Blij-de Brouwer CS, et al. Pretransplantation donor-recipient pair seroreactivity against BK polyomavirus predicts viremia and nephropathy after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2017;17(1):161-172.
  25. Radtke J, Dietze N, Fischer L, et al. Incidence of BK polyomavirus infection after kidney transplantation is independent of type of immunosuppressive therapy. *Transpl Infect Dis*. 2016;18(6):850-855.
  26. Schachtner T, Stein M, Babel N, Reinke P. The loss of BKV-specific immunity from pretransplantation to posttransplantation identifies kidney transplant recipients at increased risk of BKV replication. *Am J Transplant*. 2015;15(8):2159-2169.
  27. Renner FC, Dietrich H, Bulut N, et al. The risk of polyomavirus-associated graft nephropathy is increased by a combined suppression of CD8 and CD4 cell-dependent immune effects. *Transplant Proc*. 2013;45(4):1608-1610.
  28. Ginevri F, Azzi A, Hirsch HH, et al. Prospective monitoring of polyomavirus BK replication and impact of pre-emptive intervention in pediatric kidney recipients. *Am J Transplant*. 2007;7(12):2727-2735.
  29. Berger SP, Sommerer C, Witzke O, et al. Two-year outcomes in de novo renal transplant recipients receiving everolimus-facilitated calcineurin inhibitor reduction regimen from TRANSFORM study. *Am J Transplant*. 2019;19(11):3018-3034.
  30. Randhawa PS, Schonder K, Shapiro R, Farasati N, Huang Y. Polyomavirus BK neutralizing activity in human immunoglobulin preparations. *Transplantation*. 2010;89(12):1462-1465.

## SUPPORTING INFORMATION

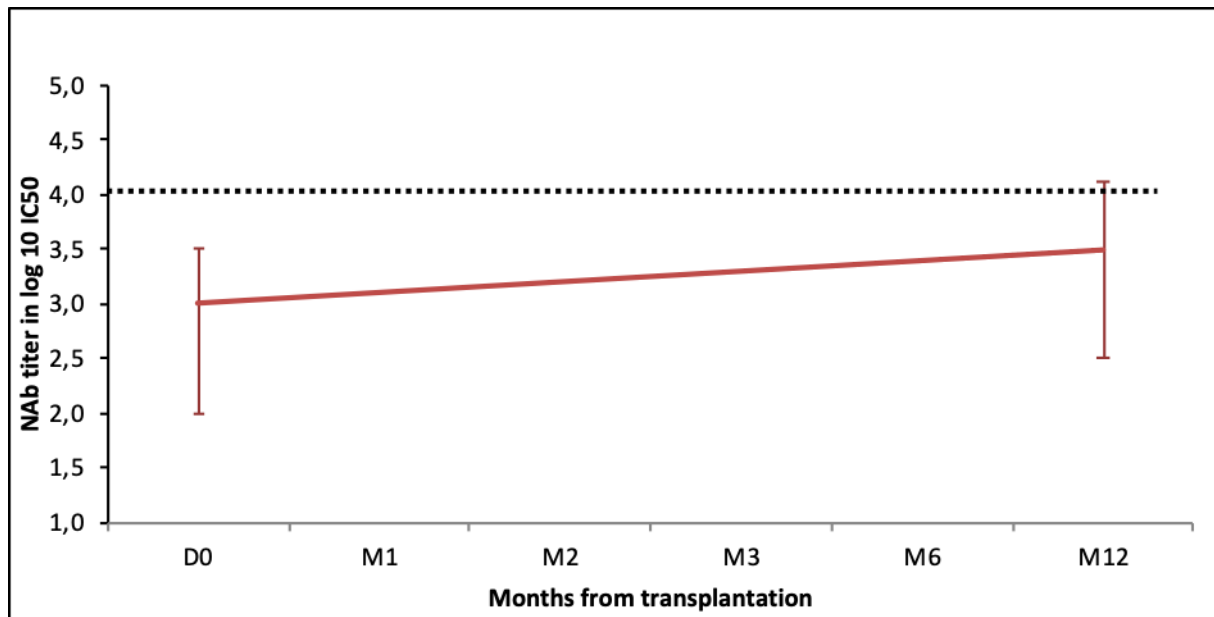
Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** Benotmane I, Solis M, Velay A, et al. Intravenous immunoglobulin as a preventive strategy against BK virus viremia and BKV-associated nephropathy in kidney transplant recipients – Results from a proof-of-concept study. *Am J Transplant*. 2021;21:329–337. <https://doi.org/10.1111/ajt.16233>



**Supplementary figure 1. Distribution of BKV serotypes at the day of**

**transplantation.** Serotype determination was performed according to NAb titers. The columns indicate the percentages of donors and recipients harboring different BKV serotypes, which were classified as follows: genotype I, genotypes I/II, genotypes I/IV, genotypes I/II/IV, genotype II, genotypes II/IV, genotype IV, and seronegative. Only four (3.3%) donors and four (2.3%) recipients were seronegative. BKV genotype I – alone or in combination with other genotypes – was detected in 138 (79.3%) recipients and 100 (83.3%) donors, respectively. Fifty-three (30.5%) recipients and 22 (18.3%) donors were seropositive for BKV genotype II, whereas 22 (12.6%) recipients and 9 (7.5%) donors were seropositive for BKV genotype IV.



**Supplementary figure 2. Temporal course of BKV NAb titers in high-risk transplant recipients not treated with intravenous immunoglobulins.** NAb titers are reported as means and standard deviations from the day of transplantation to the twelfth post-transplantation month. Only data from patients who did not show BKV viremia are presented. The assay used in the study measured titers of BKV NAb directed against the donor's strain. When the donor's specimen was unavailable, the replicating strain was considered as reference for patients showing an active BKV replication. The most common viral genotype (genotype I) was taken as reference for patients with a negative BKV DNA load. The red curve depicts the temporal course of mean NAb titers (n=26). The dotted line indicates the protective threshold against BKV replication (4 log<sub>10</sub> IC<sub>50</sub>). BKV NAb titers during the 12 post-transplantation months remained steady (p=0.20).



**Supplementary table I.** Patients management after BKV viremia occurrence according to the patient groups

	High-risk, untreated n=15	High-risk, treated with IVIg, n=3	Low-risk, untreated n=9
<b>CNI</b>			
Ciclosporin dose reduction	6/7	1/1	2/3
Tacrolimus dose reduction	3/8	2/2	4/6
Switch tacrolimus-ciclosporin	3/8	0/2	2/6
<b>MMF</b>			
MMF withdrawal	5/14	0/2	1/9
MMF dose reduction	9/14	2/2	8/9
<b>Leflunomide introduction</b>	2	0	1
<b>IVIg therapy</b>	3	1	1

CNI: calcineurin inhibitor; MMF: mycophenolate mofetil; IVIg, intravenous immunoglobulins

**Deuxième partie :**  
**SARS-CoV-2 en**  
**transplantation**  
**rénale**

# I. Revue de la littérature sur le SARS-CoV-2

## A. Historique et classification

Le virus du SARS-CoV-2 appartient à la famille des *Coronaviridae*, au genre *betacoronavirus* et au sous-genre *Sarbecovirus*.<sup>271</sup>

La famille des *Coronaviridae* est organisée en 2 sous-familles, 5 genres, 26 sous-genres et plus d'une quarantaine d'espèces. Elle tire son nom, en partie, du fait que la surface du virus est entourée d'un anneau de projections qui ressemble à une couronne solaire lorsque les virus sont observés au microscope électronique (figure 22). Cet aspect est dû à la protéine « *spike* » (S). Il existe quatre principaux sous-groupes de coronavirus, appelés alpha, bêta, gamma et delta. La plupart des coronavirus infectent les animaux (les chauves-souris, les oiseaux et les mammifères), qui agissent comme des réservoirs et des hôtes intermédiaires. Ces virus peuvent parfois changer d'hôte et infecter les humains.

Quatre coronavirus (*human coronavirus* NL63 (HCoV-NL63), HCoV-229E, HCoV-OC43 et HCoV-HKU1) sont endémiques chez l'Homme et infectent les voies respiratoires supérieures (figure 23). Ils sont responsables de 10 à 30 % des infections respiratoires hautes<sup>272</sup> et sont à l'origine d'une symptomatologie respiratoire bénigne. Au cours des trois dernières décennies, trois coronavirus zoonotiques (*severe acute respiratory syndrome coronavirus* (SARS-CoV), *Middle East respiratory syndrome coronavirus* (MERS-CoV) et SARS-CoV-2 ont infecté des humains à partir de réservoirs animaux.<sup>273-276</sup>

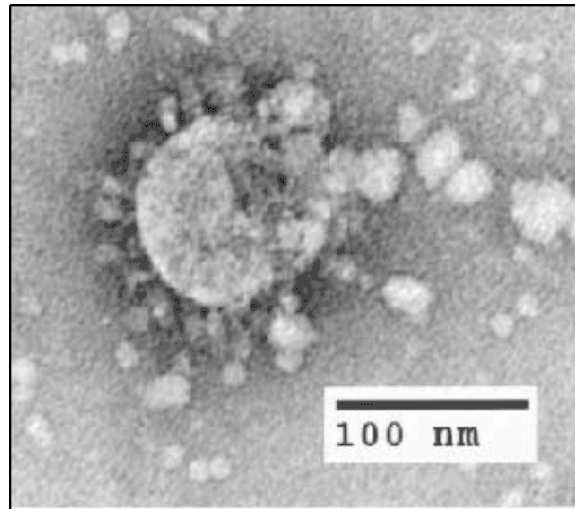


Figure 22. Particule de SARS-CoV en microscopie électronique.

La microscopie électronique à coloration négative montre une particule de SARS-CoV avec des projections de surface formant une couronne, une caractéristique des coronavirus. Source de l'image : C.D. Humphrey, CDC.<sup>277</sup>

Le SARS-CoV a émergé en Chine et a provoqué une épidémie de pneumonies en 2003, tandis que le MERS-CoV est actuellement à l'origine d'épidémies intermittentes au Moyen-Orient. Le SARS-CoV-2, l'agent causal du *Coronavirus disease 2019* (COVID-19), a été détecté pour la première fois dans la ville de Wuhan, en Chine, fin 2019 dans un groupe de patients atteints de pneumonie.<sup>276</sup> Ces trois virus peuvent se répliquer dans les voies respiratoires inférieures chez l'Homme et provoquer un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) potentiellement mortel.

Le SARS-CoV-2 aurait été transmis à l'Homme à partir de chauves-souris via un hôte intermédiaire, tout comme le SARS-CoV avec lequel il partage 79 % d'homologie de séquence. Cet hôte intermédiaire domestique ou sauvage n'est toujours pas identifié.<sup>278</sup> Les coronavirus sont généralement spécifiques d'une espèce et la transmission d'une espèce à une autre est rare. Néanmoins, certaines des espèces de coronavirus possèdent plusieurs hôtes, comme le SARS-CoV et le MERS-CoV.<sup>279</sup> Bien que les taux de mutation des coronavirus ne soient pas aussi fréquents que ceux des autres familles virales, les virus à ARN sont généralement plus sensibles

aux mutations que les virus à ADN.<sup>280</sup> Une mutation majeure du virus SARS-CoV-2 pourrait être à l'origine d'une transmission à l'Homme par contact, manipulation ou consommation d'animaux infectés.<sup>278</sup>

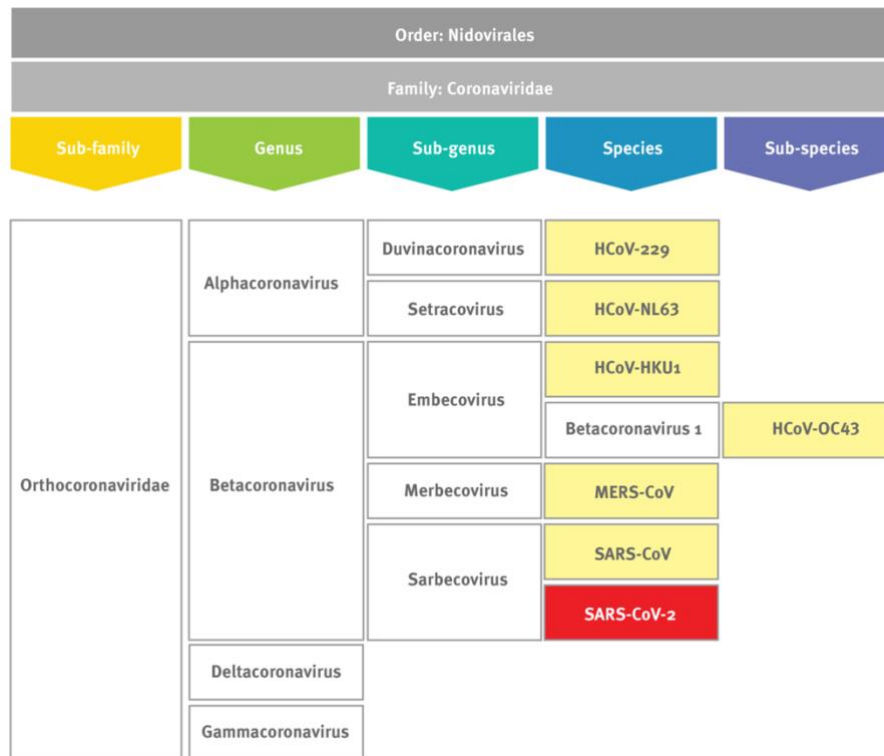


Figure 23. Taxonomie des coronavirus humains d'après l'ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*).<sup>281</sup>

## B. Caractéristiques du virus

Le SARS-CoV-2 est un virus enveloppé qui possède un génome d'ARN simple brin non segmenté de polarité positive d'environ 30 kb de longueur. Son diamètre mesure entre 50 et 200 nm.<sup>282</sup> Structuellement, il possède une enveloppe lipidique à double couche, comprenant la glycoprotéine « spike » (S), la protéine d'enveloppe (E), la glycoprotéine membranaire (M) et la protéine de nucléocapside (N). La figure 24 est une représentation schématique du virus.

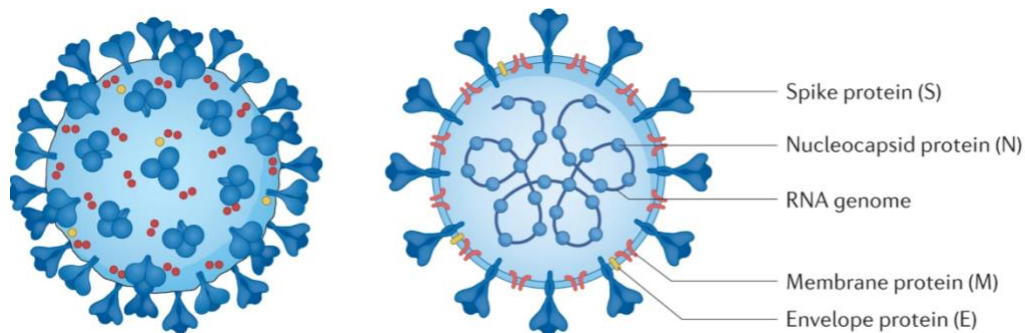


Figure 24. Structure du virus SARS-CoV-2.

### 1) *Le génome viral*

Le génome viral possède 14 cadres de lecture ouverts (*open reading frame*, ORF) et codent 29 protéines. Six ORF sont disposés dans l'ordre de 5' à 3' : la réplicase (ORF1a/ORF1b), la spike (S), l'enveloppe (E), la membrane (M) et la nucléocapside (N). De plus, une série d'ORF accessoires, qui codent pour des protéines accessoires (ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8b, ORF9b et ORF14), se situent entre ces gènes structuraux (figure 25).<sup>283,284</sup> Environ les deux tiers de l'extrémité 5' du génome du SARS-CoV-2 correspond au gène de la réplicase et codent pour deux polyprotéines dont les séquences génétiques se chevauchent : pp1a et pp1ab. Ces deux polyprotéines sont découpées par deux protéases virales en 16 protéines non structurales (NSP), essentielles à la réplication et à la transcription virales.<sup>284</sup> Le tiers restant du génome code les protéines structurales et accessoires. Au total, le virus possède : des protéines structurales, des protéines NSP et des protéines accessoires.

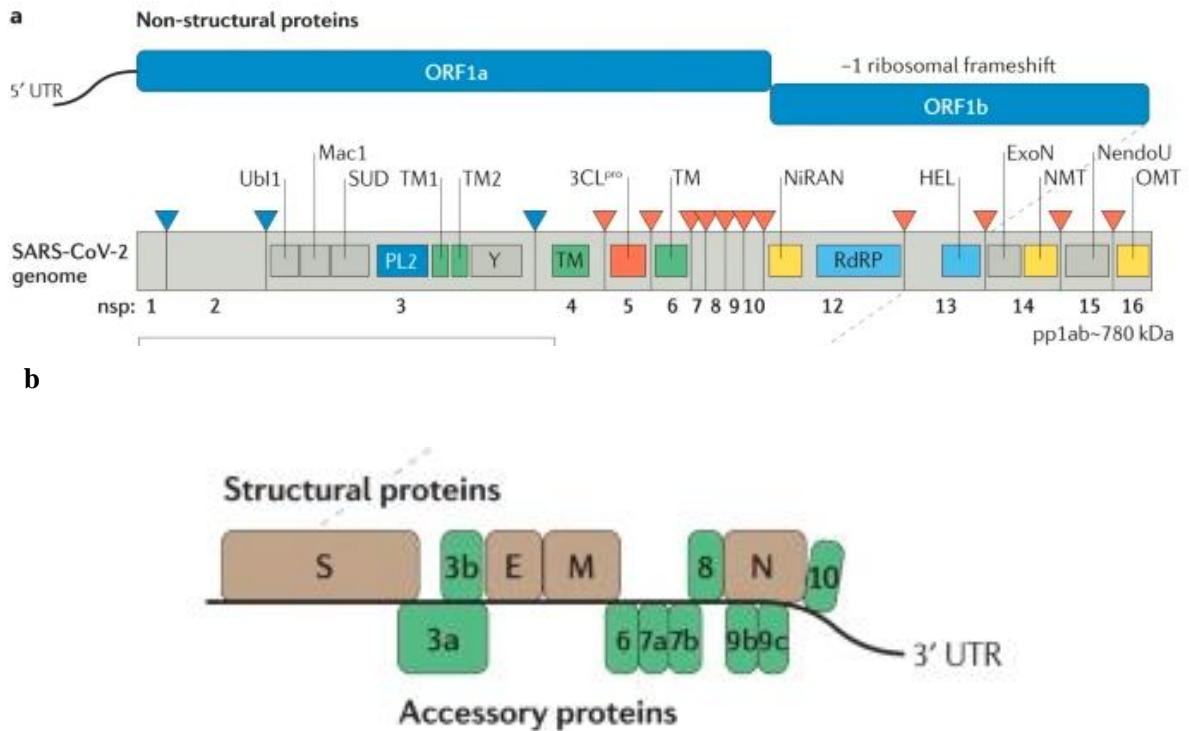


Figure 25. Organisation du génome du SARS-CoV-2.

A, les domaines fonctionnels sont indiqués dans des rectangles. La première partie de l'ARN génomique du SARS-CoV-2, codant pour des protéines non structurales (NSP), peut être directement traduite en deux polyprotéines, pp1a et pp1ab. Les deux polyprotéines sont clivées par des protéases virales pour générer 16 NSP et former la machinerie de réplication et de transcription. Les domaines qui ont une fonction importante au sein de chaque NSP sont indiqués dans la structure du génome. B, la seconde partie du génome ARN code principalement pour quatre protéines de structure : la protéine S, la protéine M, la protéine E et la protéine N. En plus de ces protéines structurales, plusieurs protéines accessoires sont également codées. D'après Yang *et al.*<sup>284</sup>

## 2) Les protéines structurales

Les protéines structurales comprennent la protéine N, la protéine S, la protéine M et la protéine E. Elles sont responsables de l'assemblage du virion et participent aussi à la suppression de la réponse immunitaire de l'hôte.

### (a) La protéine S

La protéine S est une glycoprotéine transmembranaire. Elle forme des trimères d'environ 600 KDa qui dépassent de la surface virale. Elle comprend approximativement 1200 à 1300 acides aminés. Cette protéine permet la fixation à la cellule hôte via la reconnaissance du récepteur cellulaire nommé enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (*angiotensin-converting enzyme 2*, ACE2). Elle est constituée de deux sous-unités fonctionnelles, S1 et S2. Ces sous-unités sont responsables de la médiation de l'attachement aux cellules hôtes et de la fusion membranaire. Après le clivage par une furine lors de l'entrée virale dans les cellules hôtes, les sous-unités S1 et S2 restent associées l'une à l'autre par des interactions non covalentes. La sous-unité S1 s'enroule autour d'un triple axe, recouvrant la sous-unité S2 en dessous.<sup>285</sup>

La sous-unité S1 contient un domaine de liaison au récepteur (*receptor binding domain*, RBD) et un domaine N-terminal (*N-terminal domain*, NTD).<sup>286</sup> Le domaine RBD est constitué d'une partie centrale de cinq feuillets  $\beta$ -antiparallèles, flanquée de chaque côté par une courte hélice. Entre les brins  $\beta 4$  et  $\beta 7$  antiparallèles se trouve le motif de liaison au récepteur (*receptor binding motif*, RBM) qui se compose de boucles et d'hélices  $\alpha$ , ainsi que de courts brins  $\beta 5$  et  $\beta 6$ . Le domaine RBM contient la plupart des sites de liaison du SARS-CoV-2 au récepteur ACE2. Le domaine RBD peut adopter deux états conformationnels distincts : l'état fermé ou « *down state* » et l'état ouvert ou « *up state* ». <sup>285</sup> Dans l'état fermé, les angles RBD sont proches de la cavité centrale du trimère pour protéger les régions de liaison aux récepteurs, tandis que dans l'état ouvert, le RBD subit un mouvement conformationnel semblable à une charnière, exposant ses régions déterminantes pour reconnaître le récepteur ACE2 sur la membrane cellulaire de l'hôte. La conformation « *up* » est considérée comme étant moins stable que l'état « *down* ». Le plus souvent, un seul des trois domaines RBD est en configuration « *up* » dans les trimères de la protéine S. Le domaine NTD peut reconnaître des fragments de sucre lors de la fixation initiale et jouer un rôle important dans la transition de la conformation de la protéine S. La sous-unité



S2 comprend quatre régions structurales conservées : un peptide de fusion, deux répétitions heptades (*heptad repeat 1 and 2*, HR1 et HR2) et une région transmembranaire (figure 26).

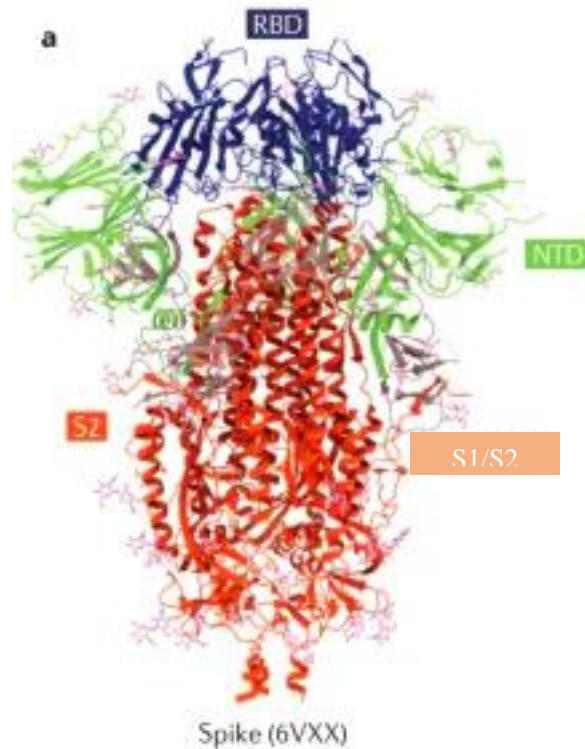


Figure 26. Représentation de la protéine S trimérique du SARS-CoV-2.

Le domaine RBD, le domaine NTD, S1/S2 et S2 sont respectivement représentés en bleu, vert, rose et rouge. Adapté de Yang et Rao.<sup>284</sup>

### (b) La protéine E

La protéine E est l'un des principaux composants membranaires du SARS-CoV-2.<sup>284,287</sup> C'est une petite protéine de 8,5 kDa composée de 75 acides aminés. Il s'agit d'une porine sélective cationique, formant un canal à travers la membrane du réticulum endoplasmique-compartiment intermédiaire de Golgi (*endoplasmic-reticulum-Golgi intermediate compartment*, ERGIC).<sup>284,288</sup> Dans le SARS-CoV, la protéine E intervient dans le bourgeonnement et la libération des virus.<sup>287</sup> Les mutations abolissant l'activité du canal réduisent la pathogénicité.<sup>289</sup> La protéine E interagit avec la protéine PALS1 (*protein associated with Lin-Seven 1*). PALS1

est une protéine cellulaire impliquée dans le maintien des jonctions serrées entre les cellules épithéliales. Les interactions entre la protéine E et PALS1 induiraient une relocalisation de PALS1 vers le site d'assemblage du virus et perturberaient les jonctions serrées favorisant la propagation du virus. De plus, la liaison PALS1-E modifie le trafic intracellulaire de la E-cadhérine avec un changement de polarisation cellulaire à l'origine d'une dérégulation sévère de la réponse médiée par Th2 en raison d'une exposition accrue aux allergènes environnementaux. La transition mésoenchymato-épithéliale se produit avec une modification significative du tissu épithélial et une production importante de chimiokines et de cytokines dans le site d'infection, favorisant l'infection des cellules voisines et améliorant potentiellement la transmission à d'autres individus.<sup>290</sup> De plus, la protéine E participe à l'activation de l'inflammasome de l'hôte.<sup>291</sup>

#### (c) La protéine N

La protéine N possède deux domaines structuraux conservés, le NTD (N-NTD) et le C-terminal domain (*protein N C-terminal domain*, N-CTD). Le domaine N-NTD existe sous forme de monomère, tandis que le domaine N-CTD existe sous forme de dimère.<sup>284,292</sup> C'est la seule protéine structurelle à l'intérieur du virion. Elle protège le génome viral et l'emballe dans un complexe ribonucléoprotéique.<sup>293</sup> La protéine N joue également un rôle dans l'antagonisme de la réponse immunitaire de l'hôte par un mécanisme d'inhibition de la synthèse de l'interféron de type I notamment.<sup>294</sup> Elle inhibe aussi les activités antivirales médiées par l'ARNi cellulaire grâce à sa liaison avec des ARN double brin.<sup>295</sup>

#### (d) La protéine M

La glycoprotéine M est responsable de l'assemblage des particules virales.<sup>296</sup>

### 3) *Les protéines non structurales*

#### (a) **Les protéases virales**

Le clivage protéolytique des deux polyprotéines pp1a et pp1ab du coronavirus génère les différentes protéines virales indispensables pour former un complexe de réplication, nécessaire à la transcription et à la réplication du génome viral et des ARNm sous-génomiques. Ce clivage se fait grâce à des protéines virales.

La NSP5, 3CL protéase ou la protéase principale (*Main Protease*, MPro) est une protéine de 306 acides aminés constituée de trois domaines.<sup>297</sup> La dimérisation est essentielle pour la fonction enzymatique de la protéine MPro. Elle clive les polyprotéines sur pas moins de 11 sites pour libérer les NSP.<sup>298,299</sup> Compte tenu de l'absence de protéine similaire chez l'Homme, ainsi que de l'importance fonctionnelle de la protéase principale dans le cycle de vie du virus, elle est une cible antivirale attrayante.

La deuxième protéase, la *papain-like protease* (PLPro) ou la protéine NSP3, est la protéase responsable du clivage de la polyprotéine au niveau de trois sites permettant la libération de NSP1, NSP2 et NSP3.<sup>300</sup> De plus, la protéine PLPro peut également cliver les protéines de l'hôte pour antagoniser la réponse immunitaire innée. Elle reconnaît et clive préférentiellement la protéine ISG15 (*Interferon-stimulated gene 15*) ce qui favorise la dégradation du facteur régulateur de l'interféron 3 (IRF3). Cela atténue les réponses de l'interféron de type I, facilitant l'échappement du virus au système immunitaire.<sup>301</sup>

#### (b) **Complexe de réplication et de transcription**

La réplication et la transcription des coronavirus sont régulées par un complexe de réplication et de transcription (*replication-transcription complex*, RTC) dont la protéine ARN polymérase ARN-dépendante (*RNA-dependent RNA polymerase*, RdRP) appelée également NSP12 joue un rôle central.<sup>302</sup> Les fonctions de la protéine RdRP nécessitent des cofacteurs, notamment NSP7

et NSP8. Seule, la protéine RdRP a une faible activité polymérase. Lors de l'ajout des cofacteurs NSP7 et NSP8, l'activité polymérase de la NSP12 est grandement améliorée.<sup>303</sup> Cette association forme le complexe holo-RdRp-ARN en se liant à l'ARN qui doit être répliqué (*template*-RNA) et à l'ARN amorce (*primer*-RNA).<sup>288</sup> La protéine NSP13 est une hélicase qui interagit avec le complexe holo-RdRp-ARN, formant le complexe NSP13-réplication-transcription (Nsp13-RTC) essentiel à la réplication et à la transcription.<sup>304,305</sup>

Les protéines NSP13, NSP12, NSP14, NSP1 et NSP9 assurent l'acquisition de la coiffe des ARNm.<sup>306-310</sup> Celle-ci est essentielle pour la traduction et la propagation virales, la protection de l'ARNm et l'évasion de la réponse immunitaire de l'hôte.<sup>311,312</sup>

Un autre aspect important concernant le RTC est son mécanisme de relecture. La plupart des virus à ARN se répliquent avec des taux d'erreur estimés entre  $10^{-3}$  et  $10^{-5}$ , ce qui entraîne environ une mutation par génome par cycle de réplication pour un génome typique d'environ 10 kb.<sup>284,313</sup> En revanche, le SARS-CoV-2, qui code la protéine NSP14 (une exonucléase avec une activité de relecture), peut maintenir un taux d'erreur inférieur lors de la réplication de son grand génome.<sup>314</sup>

#### 4) *Les protéines accessoires*

Les protéines accessoires ORF ont des actions sur le cycle viral mais aussi sur l'immunité antivirale de l'hôte.

La protéine ORF3a est une protéine membranaire de 274 acides aminés qui forme un canal ionique. Cette protéine serait impliquée dans la libération du virus, l'apoptose, l'activation de l'inflammasome et l'inhibition de l'autophagie.<sup>315</sup> La protéine ORF7a interagit avec les monocytes CD14+. Elle possède une action immunomodulatrice et déclenche une réponse inflammatoire mais le mécanisme d'interaction de l'ORF7a avec le CD14+ reste inconnu.<sup>316</sup> Cette protéine est impliquée aussi dans les interactions virus-hôte et le trafic de protéines dans

le ERGIC.<sup>284</sup> La protéine de l'ORF8 agit sur la signalisation IFN-I dans les cellules et a une activité de rétrocontrôle négatif sur le CMH-I. Son mécanisme d'action reste incertain.<sup>317</sup>

La protéine d'ORF9a inhibe la réponse immunitaire de l'IFN-I en interagissant avec la sous-unité du récepteur mitochondrial TOM70.<sup>318</sup>

### C. Cycle viral

Le virus du SARS-CoV-2 pénètre dans les cellules hôtes via les récepteurs ACE2 par l'intermédiaire de la glycoprotéine S.<sup>319</sup> Ce mécanisme d'entrée a été confirmé expérimentalement lorsque des anticorps monoclonaux anti-ACE2 ont été déployés dans des cultures cellulaires bloquant l'entrée virale.<sup>320</sup> Chez l'Homme, la protéine ACE2 permet de convertir les peptides angiotensines I et II en angiotensine 1-9 et angiotensine 1-7.<sup>321</sup> Le domaine RBM de la sous-unité S1 se lie au récepteur cellulaire, tandis que la sous-unité S2 assure la fusion avec la membrane de la cellule hôte.<sup>322</sup> Ces deux sous-unités sont séparées par le site S1-S2, qui contient un motif de clivage de la furine et est clivé par une sérine protéase transmembranaire de type II (*Transmembrane Serine Protease 2*, TMPRSS2).<sup>323,324</sup> Ce clivage active les trimères de la sous-unité S2 pour fusionner les bicouches lipidiques du virus et de la cellule de l'hôte, libérant le complexe ribonucléoprotéique viral dans la cellule (figure 27). D'autres protéines de l'hôte, telles que la neuropiline-1, les protéoglycanes de sulfate d'héparine, les lectines de type C ou la furine, peuvent également agir comme cofacteurs pour l'entrée virale.<sup>325,326</sup> Alternativement, dans certaines cellules, le SARS-CoV-2 est intériorisé dans les endosomes et, après un clivage médié par la cathepsine déclenché par un pH acide, les membranes virales fusionnent avec la membrane endosomale pour faciliter l'entrée de la nucléocapside dans le cytoplasme.<sup>327</sup>

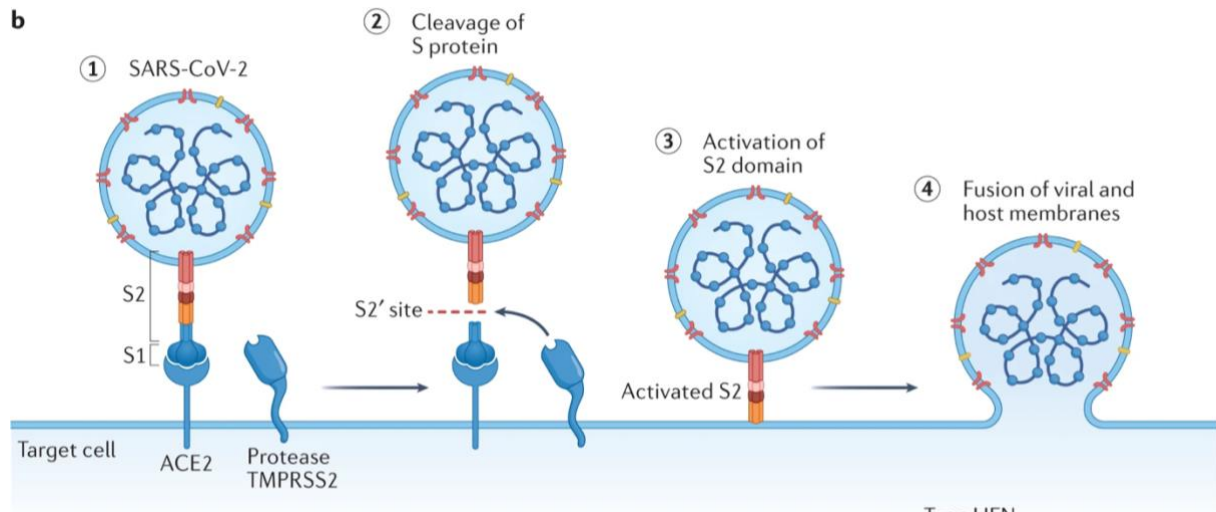


Figure 27. Mécanisme d'entrée du SARS-CoV-2.

La protéine S se fixe au récepteur ACE2 sur la cellule hôte en utilisant le domaine S1 (étape 1). Cela permet à TMPRSS2 de cliver la protéine S (étape 2), conduisant à l'activation du domaine S2 pour la fusion (étape 3). Le domaine S2 activé fusionne les bicouches lipidiques du virus et de la cellule hôte, conduisant à la libération du génome d'ARN dans la cellule hôte (étape 4). D'après Lamers *et al.*<sup>328</sup>

Ensuite, ORF1a et ORF1b sont traduits par le ribosome de la cellule hôte. Ceci est à l'origine de la production des deux polyprotéines, qui peuvent ensuite être transformées en 16 NSP matures grâce aux deux protéases virales : la protéase MPro et la protéase PLPro. Ces NSP sont capables de s'assembler dans le RTC dont la RdRP est la protéine clé. La RdRP génère l'ARN génomique viral et plusieurs ARNm sous-génomiques, qui seront traduits en protéines virales. Les protéines traduites se transloquent dans les membranes du réticulum endoplasmique et transitent du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi, où l'interaction avec l'ARN génomique encapsidé nouvellement produit entraîne un bourgeonnement dans la lumière des virions. Ces particules virales nouvellement formées sont ensuite libérées des cellules par exocytose (figure 28).<sup>278,284,329</sup>

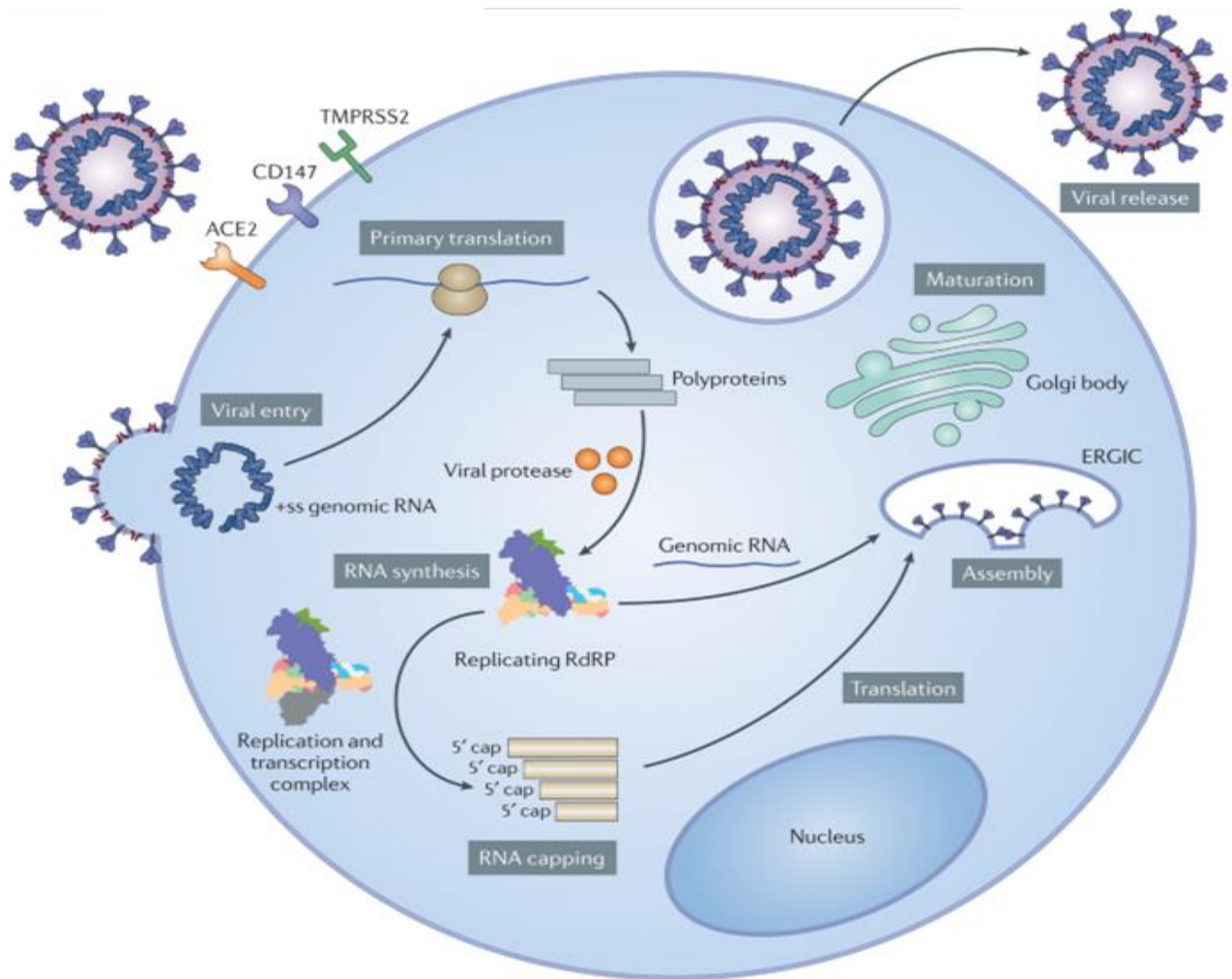


Figure 28. Cycle viral du SARS-CoV-2. D'après Yang *et al.*<sup>284</sup>

#### D. Tableaux cliniques du COVID-19

L'infection par le virus du SARS-CoV-2 est à l'origine du COVID-19. Le virus est transmis par l'intermédiaire des gouttelettes ou des aérosols. En se liant aux cellules épithéliales des voies respiratoires, le SARS-CoV-2 commence à se répliquer et à migrer dans les voies respiratoires et pénètre dans les cellules épithéliales alvéolaires des poumons.

La période d'incubation avant l'apparition des symptômes est en moyenne de 4 à 5 jours.<sup>330</sup>

Dans la majorité des cas, l'infection provoque une atteinte bénigne à modérée. Les symptômes les plus fréquents sont à l'origine d'une atteinte respiratoire avec de la toux qui peut être associée à de la fièvre, des céphalées, des myalgies/arthralgies, une anosmie/agueusie et des

signes digestifs.<sup>282,331–333</sup> Il existe également des cas d'atteinte asymptomatique mais aussi des atteintes sévères. La sévérité de la maladie est due au syndrome de relargage cytokinique (SRC) qui provoque un SDRA et parfois des défaillances multiviscérales. Les patients présentent alors une dyspnée sévère à l'origine d'une hypoxémie environ une semaine après le début des symptômes.<sup>332–334</sup> Le SDRA est défini par une hypoxémie sévère et des opacités radiographiques bilatérales qui ne sont pas entièrement expliquées par une insuffisance cardiaque ou une surcharge hydrique et qui surviennent dans les 7 jours suivant l'exposition à des facteurs prédisposants connus.<sup>335</sup> L'OMS a classé la pathologie en 5 classes (asymptomatique, bénigne, modérée, sévère et critique [tableau II])

Tableau II. Classification OMS des formes cliniques de COVID-19

<b>Classes</b>	<b>Symptômes</b>
<b>Asymptomatique</b>	
<b>Atteinte bénigne</b>	Patients symptomatiques répondant à la définition du cas de COVID-19, exempts de signes de pneumonie virale ou d'hypoxie.
<b>Atteinte modérée</b>	Signes cliniques de pneumonie (fièvre, toux, dyspnée, respiration rapide), mais aucun signe de pneumonie sévère.
<b>Atteinte sévère</b>	Signes cliniques de pneumonie associés à l'un des signes ou symptômes suivants : fréquence respiratoire > 30 respirations/min ; détresse respiratoire sévère ; ou SpO2 < 90% en air ambiant
<b>Atteinte critique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA)</li> <li>- État septique</li> <li>- Choc septique</li> <li>- Thrombose aiguë</li> </ul>

Le SARS-CoV-2 peut également entraîner des atteintes extra-pulmonaires : des symptômes gastro-intestinaux, des lésions cardiaques, rénales et hépatiques aiguës, des rhabdomyolyses, des encéphalopathies et des coagulopathies.<sup>336–343</sup> L'expression de la protéine ACE2 est



présente dans de multiples organes : le cœur, les reins, les testicules, les poumons, les muqueuses nasales et orales et le nasopharynx, le tube digestif (sauf le côlon), la peau et les cellules endothéliales et musculaires lisses du cerveau.<sup>344</sup> Il existe par ailleurs des preuves d'une infection répliquative des entérocytes intestinaux<sup>345</sup>, qui expriment des niveaux plus élevés d'ACE2 que les cellules respiratoires.

### **E. Facteurs de risque de COVID-19 sévère**

L'âge, le sexe masculin ainsi que les comorbidités (l'obésité, l'hypertension artérielle, l'insuffisance cardiaque, l'arythmie cardiaque, le diabète, l'insuffisance rénale chronique, un cancer actif et les maladies pulmonaires chroniques) sont des facteurs de risque bien établis pour le développement de COVID-19 sévère.<sup>346-350</sup> Des études d'association à l'échelle du génome ont établi des associations entre les loci et le COVID-19 sévère. Plusieurs de ces loci correspondent à des associations précédemment documentées avec des maladies pulmonaires, des maladies auto-immunes ou inflammatoires telles que DPP9 et FOXP4. D'autres loci correspondent aux gènes des récepteurs de chimiokines tels que CXCR6 et CCR9 où sont impliqués dans la détection de l'interféron de type I.<sup>351-353</sup>

### **F. Pathogenèse du SARS-CoV-2**

#### **1) *Une réponse interféron I et III insuffisante à l'origine de COVID-19 sévère***

Les premières cellules ciblées par le SARS-CoV-2 lors d'une infection chez l'Homme sont probablement les cellules ciliées des voies respiratoires ACE2+TMPRSS2+ dans le nasopharynx ou la trachée.<sup>354-356</sup> Ces cellules expriment des niveaux élevés d'ACE2 et de TMPRSS2 sur la membrane apicale malgré de faibles niveaux d'ARNm.<sup>354,355,357</sup> Dans la plupart des cas de COVID-19, l'infection est probablement éliminée à ce stade par l'induction d'une réponse de type interféron I (interférons  $\alpha/\beta$ ) ou de type interféron III (interféron  $\lambda$ ) et l'induction des réponses lymphocytaires B et T. Cependant, dans certains cas, le SARS-CoV-2

peut pénétrer profondément dans les poumons par l'inhalation de particules virales provenant des voies respiratoires supérieures, se propager progressivement en infectant les cellules des voies respiratoires distales le long de l'arbre trachéobronchique ou infecter directement les cellules des voies respiratoires inférieures. La dissémination du SARS-CoV-2 dans les voies respiratoires distales peut être secondaire à une réponse interféron de type I ou de type III retardée ou efficacement inhibée.<sup>328</sup> Elle serait à l'origine de la gravité du COVID-19 avec un SRC qui provoquerait un SDRA pouvant être associé à une défaillance multiviscérale.<sup>358</sup> En effet, la production d'IFN-I joue un rôle essentiel dans l'immunité antivirale dans les premiers stades de l'infection.<sup>359,360</sup> Chez l'Homme, des cas de COVID-19 sévères ont été rapportés chez des patients présentant des auto-anticorps contre l'interféron<sup>361-363</sup>, des défauts innés de signalisation dans la voie des interférons<sup>362,364</sup> et une faible induction de réponses locales et systémiques à l'interféron.<sup>365,366</sup> Le vieillissement favoriserait une réponse interféron moins efficace.<sup>367</sup> Les travaux effectués sur les coronavirus de souris ont montré que les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pCD) et l'interféron de type I dérivé des pCD sont cruciaux pour contrôler l'infection par le coronavirus.<sup>367</sup> Les pCD sont spécialisées dans la production rapide de grandes quantités d'interféron de type I en réponse aux virus et sont considérées comme particulièrement importantes pour contrôler les infections virales pulmonaires.<sup>368</sup> Chez l'Homme, la réactivité de ces pCD était altérée chez les patients atteints de COVID-19 sévère.<sup>369</sup> À l'inverse, les patients atteints de COVID-19 léger avaient des taux sanguins élevés d'IFN $\alpha$  et d'IFN $\lambda$  à des moments précoces de l'infection.<sup>369</sup>

L'initiation retardée de la réponse IFN-I augmentait l'hyperinflammation, en recrutant des monocytes et des macrophages dans des modèles murins de COVID-19 exprimant l'ACE2 humain.<sup>370</sup> Chez les souris BALB/c infectées par le SARS-CoV, une réponse IFN-I retardée mais considérable induit l'accumulation de monocytes et de macrophages et la production de cytokines pro-inflammatoires, entraînant une pneumonie mortelle, une hyperperméabilité

vasculaire et des réponses insuffisantes des lymphocytes T.<sup>371</sup> Chez l'Homme, cette réponse retardée était associée à une charge virale SARS-CoV-2 sanguine élevée.<sup>365</sup>

## 2) *Propagation de l'infection vers les voies respiratoires basses, SRC et SDRA*

Les réponses interféron de type I ou de type III retardées ou efficacement inhibées entraînent la propagation du virus vers les voies respiratoires inférieures. Les cellules ciliées des voies respiratoires inférieures sont alors la principale cible du SARS-CoV-2.<sup>372</sup> L'infection entraînerait la perte des cils ce qui peut perturber le flux ascendant de mucus dans les voies respiratoires ramifiées,<sup>373</sup> facilitant éventuellement la dissémination du virus dans les alvéoles. Une fois que le virus atteint les alvéoles, les cellules épithéliales alvéolaires de type 2 (AT2) seraient infectées car elles expriment les protéines ACE2 et TMPRSS2.<sup>328</sup> L'infection par le SARS-CoV-2 de ces cellules conduit à l'induction d'une réponse à l'interféron de type I et de type III. Les dommages alvéolaires peuvent être secondaires à un effet direct de l'infection des cellules AT2 ou un effet indirect causé par des réponses inflammatoires locales, qui peuvent entraîner une activation endothéliale.

Les cellules AT2 adoptent un phénotype de progéniteur transitoire associé aux dommages (*damage-associated transient progenitors, DATP*), un état cellulaire AT2 associé aux lésions pulmonaires qui se caractérise par une incapacité à se différencier complètement en cellules AT2.<sup>374,375</sup> Les patients présentent des signes d'hyperinflammation systémique avec une majoration de la libération de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'interleukine-1 (IL-1), l'IL-6, l'IL-8 et le TNF, et des concentrations élevées de marqueurs inflammatoires tels que la ferritine et la protéine C-réactive (CRP).<sup>282,376</sup> En effet, les taux sériques d'IL-6, d'IL-8 et de TNF au moment de l'hospitalisation sont des prédicteurs puissants et indépendants de la survie des patients.<sup>376</sup> Le SDRA, se caractérise par des lésions pulmonaires avec une inflammation, une hyperperméabilité vasculaire pulmonaire et par conséquent une perte de tissu pulmonaire

aéré. L'examen histologique des cas de SDRA a montré que la majorité des patients ayant un COVID-19 sévère présentaient des lésions pulmonaires histologiques communes de type « dommage alvéolaire diffus » (DAD).<sup>377</sup> Il s'agit de lésions des cellules endothéliales et alvéolaires à l'origine d'une exsudation liquidienne et cellulaire, évoluant dans certains cas vers une fibrose interstitielle étendue.<sup>378</sup> Le DAD est généralement caractérisé par une phase exsudative initiale comprenant un œdème alvéolaire, la mort cellulaire, la formation de membranes hyalines et une inflammation. La mort ou les dommages des cellules alvéolaires entraînent une dégradation de l'épithélium alvéolaire, ce qui déclenche la formation de membranes hyalines. Celles-ci sont constituées d'exsudats riches en fibrine qui empêchent l'accumulation de liquides dans les alvéoles mais limitent également les échanges d'oxygène.<sup>379</sup> La phase exsudative est suivie par une phase proliférative avec une hyperplasie des cellules AT2 pour tenter de régénérer les alvéoles. Dans certains cas, il peut y avoir une phase fibrotique avec une fibrose principalement dans les septa alvéolaires. La pathogénie du SARS-CoV-2 est schématisée figure 29.

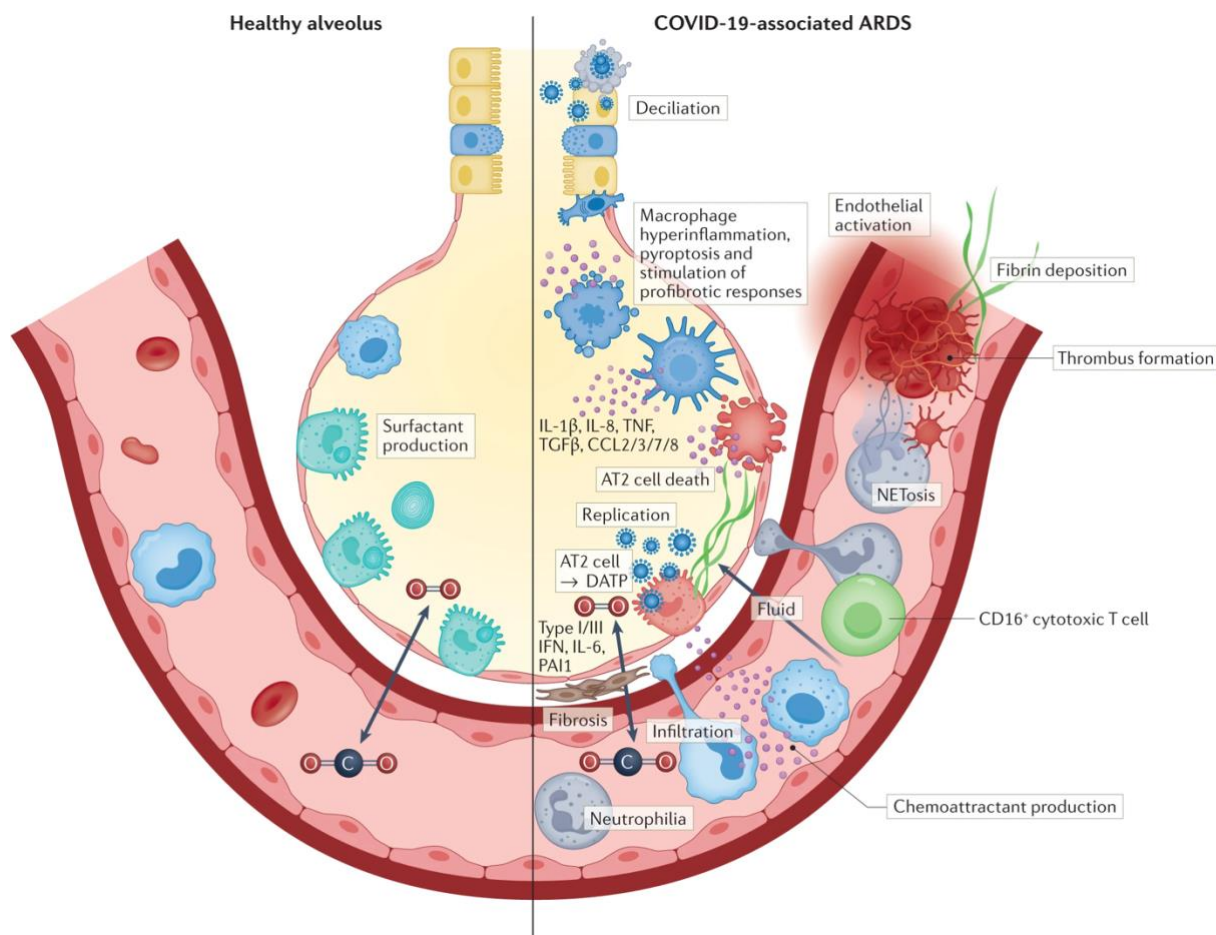


Figure 29. Pathogénèse du SDRA dans le COVID-19.

L'épithélium et l'endothélium endommagés entraînent une exsudation de liquide dans les alvéoles. La matrice extracellulaire sous-endothéliale exposée attire et active les plaquettes et initie la cascade de coagulation, conduisant au dépôt de fibrine. Dans le même temps, les cellules immunitaires ayant des phénotypes dysfonctionnels sont attirées, et peuvent favoriser davantage l'inflammation et la coagulation. Les neutrophiles, activés par les plaquettes, libèrent des pièges extracellulaires de neutrophiles (*Neutrophil Extracellular Traps*, NET) contenant du facteur tissulaire, favorisant la formation de microthrombi. Les macrophages dans les alvéoles peuvent adopter un phénotype profibrotique pro-inflammatoire et, lorsqu'ils sont infectés, peuvent entrer en pyroptose, tandis que l'hyperinflammation peut favoriser la PANoptose des cellules T. Les lymphocytes T CD16+ sont induits par l'activation du complément et favorisent les lésions des cellules endothéliales microvasculaires et la libération de chimiokines. Ceci conduit à un tissu pulmonaire hautement inflammatoire et inondé, altérant l'échange d'oxygène et conduisant à une hypoxémie. D'après Lamers *et al.*<sup>328</sup>

### 3) COVID-19 et hypercoagulabilité

Lors de COVID-19 sévères, il existe un déséquilibre entre l'activation de la coagulation et l'inhibition de la fibrinolyse<sup>380</sup> responsable de la formation de thrombi de fibrine. Ces derniers

obstruent les petits vaisseaux artériels (moins de 1 mm de diamètre) dans les cas les plus graves de COVID-19.<sup>381-384</sup> L'état prothrombotique observé chez les patients atteints de COVID-19 rappelle un processus connu sous le nom d'immunothrombose, dans lequel les systèmes immunitaire et de coagulation coopèrent pour bloquer les agents pathogènes et limiter leur propagation.<sup>385,386</sup> Une grande variété de stimuli, tels que l'hypoxie, les cytokines, les chimiokines et les DAMPS peuvent déclencher une destruction de l'épithélium et de l'endothélium. Ces stimuli déclenchent une activation endothéliale et peuvent entraîner la mort des cellules endothéliales, ce qui a été observé dans les cas de COVID-19.<sup>387</sup> Dans des conditions physiologiques, le facteur tissulaire se trouve à l'intérieur des cellules endothéliales et dans les tissus, mais lorsque l'endothélium est détruit, les facteurs de coagulation vasculaire peuvent interagir avec le facteur tissulaire, déclenchant la voie de la coagulation extrinsèque et conduisant finalement au clivage du fibrinogène en fibrine, un composant majeur des caillots et des membranes hyalines (figure 29).<sup>388</sup> Les lésions tissulaires peuvent également déclencher la voie de la coagulation intrinsèque par l'activation du facteur XII par des stimuli tels que l'ARN extracellulaire, l'ADN et le collagène exposé.<sup>389</sup> Les cellules immunitaires, attirées par les cytokines et les chimiokines, contribuent aussi à la coagulation.<sup>386</sup> Les monocytes peuvent présenter le facteur tissulaire à leur surface.<sup>386,390</sup> Les neutrophiles libèrent des pièges extracellulaires de neutrophiles (*Neutrophil Extracellular Traps*, NET) qui contiennent du facteur tissulaire et de l'ADN, stimulant la voie de la coagulation intrinsèque et extrinsèque. Les NET stimulent également la coagulation en recrutant des plaquettes, qui à leur tour peuvent libérer des cytokines pro-inflammatoires et stimuler la NETose (la formation de NET).<sup>391,392</sup> De plus, le SARS-CoV-2 peut déclencher l'activation du complément, en particulier la voie des lectines, conduisant à la génération du fragment de clivage C5a, qui augmente l'expression du facteur tissulaire par les neutrophiles.<sup>393,394</sup> La formation de thrombi de fibrine est habituellement contrecarrée par la voie de la fibrinolyse. Cette voie est inhibée par l'inhibiteur

de l'activateur du plasminogène 1 (PAI1). L'expression de PAI1 est fortement augmentée dans le COVID-19, et des niveaux élevés de PAI1 sont associés à un état respiratoire plus mauvais.<sup>395,396</sup> La figure 30 illustre ce mécanisme d'immunothrombose.

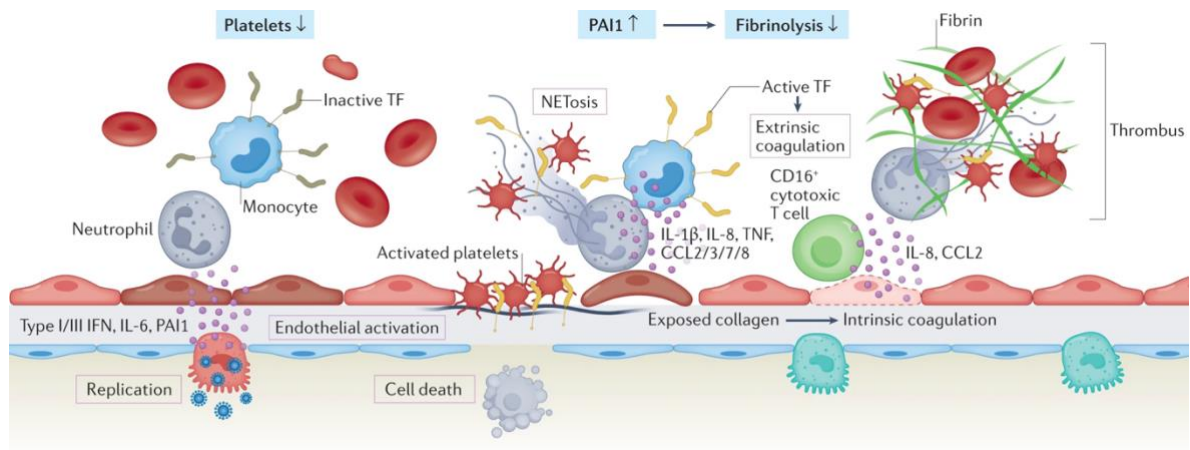


Figure 30. Déséquilibre de la coagulation et de la fibrinolyse lors de COVID-19 sévères. D'après Lamers *et al.*<sup>328</sup>

## G. Réponse immunitaire

### 1) Réponse immunitaire innée

Les cellules immunitaires innées pourraient initier des réponses immunitaires à l'infection virale après avoir détecté des motifs moléculaires liés au virus (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPS) via leurs récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (*pattern recognition receptor*, PRR) tels que les récepteurs de type Toll (*toll-like receptors*, TLR), les récepteurs de type RIG-I (*RIG-I-like receptors*, RLR) et les récepteurs de type NOD (*NOD-like receptors*, NLR).<sup>397-399</sup> Cette reconnaissance induit l'activation des réponses IFN de types I et III, suivie de la libération de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, fournissant ainsi une défense antivirale contre l'infection virale.<sup>400</sup> Par exemple, l'ARN génomique et/ou l'ARN double brin généré pendant la réplication sont détectés par les récepteurs RLR tels que le gène I inducible par l'acide rétinoïque (*Retinoic acid-inducible gene I*, RIG-I) ou le gène 5 associé

à la différenciation du mélanome (*melanoma differentiation-associated protein 5*, MDA5).<sup>326,401</sup> Néanmoins, dans le cadre du SARS-CoV-2 l'effet de RIG reste débattu avec des données montrant des résultats contradictoires sur la stimulation de la production de l'IFN I/III.<sup>326</sup> Les IFN de type I et de type III se lient à leurs récepteurs puis activent les gènes ISG.<sup>402</sup> Des centaines d'ISG sont stimulés pour exercer des effets antiviraux en empêchant les virus d'entrer, de se répliquer et de bourgeonner.<sup>401</sup> Les ISG et les cytokines pro-inflammatoires issus de l'activation de l'IFN de type I/III pourraient directement inhiber la réplication du virus, recruter et activer diverses cellules immunitaires.

Le SARS-CoV-2 a développé plusieurs stratégies d'évasion pour contrer cette défense immunitaire innée. Il peut spécifiquement échapper aux réponses immunitaires innées antivirales en réduisant les niveaux d'IFN. L'infection par le SARS-CoV-2 limite la production d'IFN de types I et III aux niveaux post-transcriptionnels en empêchant la libération d'ARNm des sites de transcription et/ou en déclenchant la dégradation du transcrit dans le noyau.<sup>403</sup> Le SARS-CoV-2 code également plusieurs protéines qui perturbent la voie de détection des RLR et les fonctions d'induction, de signalisation ou d'effecteur de l'IFN. Par exemple, la protéine PLPro inhibe l'activation de MDA5.<sup>404</sup> De plus, les protéines ORF9b, N et M peuvent inhiber l'expression de l'IFN- $\beta$  et des cytokines pro-inflammatoires en interférant avec les voies RIG-I et MDA5.<sup>405-408</sup> ORF9b peut également bloquer le récepteur TLR3.<sup>409</sup> ORF6 et ORF8 inhibent l'expression d'IFN- $\beta$  et l'activation d'ISG.<sup>406</sup> NSP1 et NSP14 et potentiellement d'autres protéines virales peuvent inhiber la traduction et empêcher l'expression des composants de la voie de signalisation IFN.<sup>410,411</sup>



## 2) Réponse immunitaire adaptative

### (a) Réponse immunitaire cellulaire T

Des lymphocytes T spécifiques du SARS-CoV-2 sont observés chez la plupart des patients lors d'une infection aiguë.<sup>361,412,413</sup> La réponse des lymphocytes T CD4+ et CD8+ est dirigée contre plusieurs antigènes différents du SARS-CoV-2, avec des réponses fortes particulièrement observées contre les protéines S et N.<sup>414-416</sup> La prévalence et l'ampleur des réponses sont en corrélation avec le niveau d'expression de chaque protéine du SARS-CoV-2.<sup>417</sup> La plupart des lymphocytes T CD4+ spécifiques du SARS-CoV-2 présentent un profil Th1. Ils présentent en majorité un phénotype CCR7+CD45RA- (mémoire centrale ; 50 à 60 %) et CCR7-CD45RA- (mémoire effectrice ; 25 à 40 %) pendant l'infection aiguë et au cours du suivi.<sup>415,416</sup> Les lymphocytes CD8+ présentent un phénotype CCR7-CD45RA- (mémoire effectrice ; 40 à 60 %) avec une capacité cytotoxique accrue, des niveaux élevés de marqueurs d'activation immunitaire (Ki-67, CD38, HLA-DR, CD69) et des réponses médiées par Th2 et Th17 inférieures.<sup>413,415,416,418,419</sup> Ce phénotype immunitaire est classique dans d'autres infections virales aiguës.<sup>420</sup>

Initialement, la réponse lymphocytaire T était soupçonnée de jouer un rôle négatif dans la constitution du SRC. Néanmoins, les données ont montré que l'origine du SRC ne provient pas des cellules T, mais est très probablement dérivée de la lignée des cellules myéloïdes.<sup>421</sup>

La réponse lymphocytaire T spécifique du SARS-CoV-2 aurait un impact sur la sévérité du COVID-19. Une réponse précoce des lymphocytes T CD4+ et T CD8+ et des anticorps est corrélée avec un COVID-19 moins sévère.<sup>412</sup> De même, les cellules CD4+ sécrétant de l'IFN- $\gamma$  étaient moins fréquemment observées aux stades précoces (jours 1 à 15) et aux stades tardifs (jours 15 à 30) chez les patients ayant un COVID-19 modéré/sévère par rapport aux cas bénins.<sup>414</sup> De façon intéressante, une réponse des lymphocytes T CD8+ précoce pourrait être à

l'origine d'une maladie asymptomatique.<sup>422</sup> Certaines études ont également montré que le nombre des lymphocytes T n'était pas associé à la guérison dans les cas critiques de COVID-19.<sup>413,423</sup> En effet, les lymphocytes T spécifiques du SARS-CoV-2 dans les cas de COVID-19 sévère peuvent avoir une fonctionnalité restreinte malgré un nombre élevé. Par exemple, le pourcentage total de lymphocytes T CD4+ polyfonctionnels spécifiques du SARS-CoV-2 (produisant de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$  et de l'IL-2) était significativement plus faible chez les patients en soins intensifs que chez les convalescents.<sup>423</sup> Une autre étude confirme l'importance de lymphocytes T CD4+ polyfonctionnels en montrant que le COVID-19 sévère n'est pas associé à la quantité des lymphocytes T CD4+ mais plutôt à une polyfonctionnalité et une capacité proliférative diminuée.<sup>424</sup> Les données actuelles indiquent donc que l'induction précoce de lymphocytes T polyfonctionnels spécifiques du SARS-CoV-2 est en corrélation avec le contrôle viral et une maladie bénigne, tandis que l'activation retardée des lymphocytes T entraîne de mauvaises réponses fonctionnelles, une clairance basse du virus et, finalement, des réactions COVID-19 graves, potentiellement mortelles.<sup>425</sup>

La plupart des patients convalescents présentent une réponse durable des anticorps et des lymphocytes T mémoires spécifiques au SARS-CoV-2 après un COVID-19.<sup>426</sup> Les lymphocytes T CD4+ et CD8+ spécifiques du SARS-CoV-2 sont détectés *ex vivo* chez 100 % et 70 % des patients ayant eu un antécédent de COVID-19, respectivement.<sup>427</sup> La demi-vie de ces lymphocytes est d'environ 200 jours.<sup>415</sup> Les cellules T restent détectables pendant au moins 6 à 12 mois post-infection.<sup>415,426,428-430</sup> Les lymphocytes T CD4+ et CD8+ conservent leurs caractéristiques polyfonctionnelles pendant plus de 180 jours. Alors que les cellules T CD4+ présentent des réponses fonctionnelles similaires contre les protéines structurales et accessoires du SARS-CoV-2, les cellules T CD8+ montrent une reconnaissance préférentielle de la protéine de la nucléocapside.<sup>415,416</sup> La réponse lymphocytaire T spécifique est plus faible chez les personnes ayant eu un COVID-19 asymptomatique.<sup>431</sup> Ces lymphocytes T sont tout de même

polyfonctionnels avec une sécrétion coordonnée des cytokines pro-inflammatoires et régulatrices (IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$ ).<sup>429,432</sup> De façon intéressante, plusieurs études ont montré que les individus séronégatifs fortement exposés au virus présentent une réponse T détectable et significativement plus forte que chez les personnes saines et non exposées.<sup>418,433,434</sup>

Des infections antérieures par des coronavirus humains endémiques pourraient être à l'origine de réactions immunitaires croisées contre le SARS-CoV-2. Les lymphocytes T CD4+ mémoires réactifs contre le SARS-CoV-2 sont détectables *ex vivo* chez environ 20 à 50 % des personnes non exposées et détectables chez presque tous les individus après une expansion *in vitro*<sup>435</sup> alors que les lymphocytes T CD8+ mémoires sont moins fréquemment détectés dans le sang périphérique.<sup>427</sup> De plus, les lymphocytes T CD4+ et CD8+ spécifiques des coronavirus endémiques provenant de donneurs non exposés au SARS-CoV-2 montrent une réactivité aux antigènes du SARS-CoV-2 et vice versa.<sup>435-439</sup> Par ailleurs, des clones partagés peuvent être détectés entre les cellules T spécifiques des coronavirus endémiques et du SARS-CoV-2 chez des individus non infectés.<sup>439,440</sup> Ces cellules T CD4+ et CD8+ à réaction croisée sont généralement dirigées contre des épitopes hautement conservés des coronavirus.<sup>437,438,440-442</sup> Ils semblent être bénéfiques dans le contrôle de l'infection. Des études montrent qu'une infection récente par un coronavirus endémique est associée à un COVID-19 moins grave et à une mortalité réduite.<sup>443</sup> De plus, l'étude du sang périphérique d'individus avant et après une infection par le SARS-CoV-2 montre que les lymphocytes T CD4+ et CD8+ préexistants peuvent être mobilisés et multipliés après l'infection,<sup>440,444</sup> mais ne semblent pas empêcher la génération d'une réponse cellulaire T primaire hautement polyclonale après infection.<sup>425,440</sup> Une autre étude montre que les réponses des lymphocytes T CD8+ dirigées contre une région hautement conservée de la polymérase des coronavirus peuvent être détectées chez des individus non infectés et de manière plus importante chez les soignants exposés au SARS-CoV-2, soignants qui n'ont pas été infectés par la suite.<sup>444</sup> Ces réponses des lymphocytes T ciblent

une protéine qui s'exprime de façon précoce au cours du cycle viral, ce qui pourrait potentiellement écourter la réplication et prévenir l'infection.<sup>440</sup>

Une des limitations des études s'intéressant à l'immunité cellulaire anti-SARS-CoV-2 est qu'elles ne prennent pas en considération « l'immunité spécifique aux tissus », en particulier dans les voies respiratoires supérieures et inférieures avec l'étude des lymphocytes T mémoires résidant dans les tissus. Ces cellules sont générées préférentiellement au site initial de l'infection, résident uniquement dans les tissus, ne circulent pas dans le sang périphérique. Ce sont des médiateurs cruciaux de protection contre l'exposition virale secondaire.<sup>445</sup>

### **(b) Réponse humorale**

L'infection par le SARS-CoV-2 stimule la production rapide d'anticorps de types IgM, IgG et IgA. Ces anticorps peuvent être détectés dans le sérum dès la première semaine post-infection. Il s'agit d'anticorps dirigés contre les protéines S et N.<sup>432,446-448</sup> La rapidité de ces réponses suggère que les anticorps ont une origine extra-folliculaire.<sup>449</sup> Le pic des anticorps (neutralisants et non neutralisants) est mesuré 3 à 4 semaines post-infection.<sup>446,447</sup> Ce taux diminue progressivement<sup>447,450</sup>, puis reste relativement stable pendant des mois.<sup>426,451</sup> Les anticorps de type IgG sont plus stables que les anticorps IgM et IgA.<sup>446</sup> Cette cinétique s'explique par la participation des plasmocytes à longue durée de vie issus du centre germinatif. Des titres d'anticorps neutralisants et non neutralisants plus élevés sont retrouvés chez les personnes atteintes de COVID-19 sévères.<sup>426,432,452</sup> Ceci s'expliquerait par une charge virale élevée et persistante et donc une stimulation antigénique plus importante.<sup>453,454</sup>

Les anticorps muqueux, et en particulier les IgA sécrétoires, dans les voies respiratoires peuvent jouer un rôle important dans la prévention de la transmission du SARS-CoV-2 par les voies respiratoires.<sup>454</sup> Les IgA sécrétées sous forme de dimères ont une activité neutralisante plus importante que les IgA sériques monomères et les anticorps d'autres isotypes.<sup>455</sup> Ces IgA

spécifiques du virus sont détectées dans la salive des individus infectés.<sup>446</sup> Des anticorps IgA neutralisants dans les sécrétions nasales ont été également retrouvés chez des professionnels de santé séronégatifs, suggérant une réponse strictement locale dans le tissu lymphoïde associé au nasopharynx.<sup>456</sup> Des niveaux significatifs d'anticorps anti-SARS-CoV-2, y compris des IgA neutralisants, persiste dans les liquides nasaux pendant des mois.<sup>457,458</sup> Ils contribuent à la protection vis-à-vis des réinfections. La représentation schématique de cette réponse humorale est représentée en figure 31.

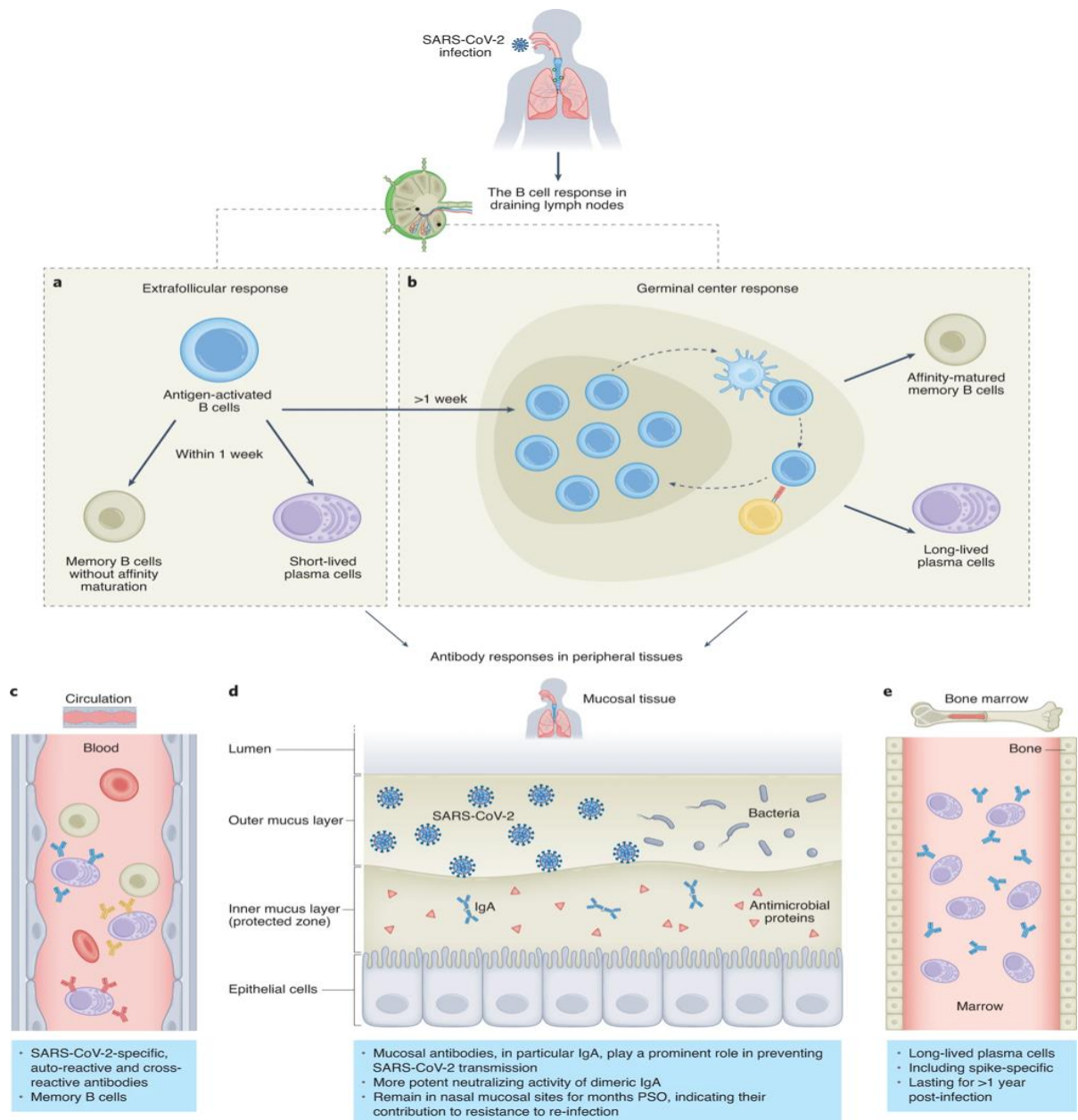


Figure 31. Réponse des lymphocytes B et des anticorps à l'infection par le SAR2-CoV-2.

A, La réponse extrafolliculaire. Les lymphocytes B se différencient soit en plasmocytes à courte durée de vie, en cellules B mémoires avec peu de mutations, soit en participant à la réaction du centre germinatif ; B, Réaction au centre germinatif : augmentation de l'affinité et différenciation potentiellement en plasmocytes à longue durée de vie pour sécréter des anticorps neutralisants de haute affinité (c–e) ; C, Dans les vaisseaux sanguins, les lymphocytes B mémoires rejoignent le système circulatoire en surveillance, et les plasmocytes migrent vers les sites inflammatoires pour lutter contre l'infection. D'autres anticorps, comme les anticorps à réaction croisée sécrétés par d'autres plasmocytes induits par une infection virale, contribuent à la clairance du SARS-CoV-2 ; D, Dans les sites muqueux, en particulier dans les tissus nasaux, les IgA dimères protègent de l'invasion et de la réinfection par le SARS-CoV-2 ; E, Dans la moelle osseuse, des

plasmocytes à longue durée de vie résident et aident à maintenir les niveaux d'anticorps anti-SARS-CoV-2 chez l'hôte. D'après Qi *et al.*<sup>448</sup>

Les cellules B acquièrent des mutations du gène d'immunoglobuline augmentant l'affinité et se différencient potentiellement en plasmocytes à longue durée de vie grâce à l'action des lymphocytes T CD4+ *helper* au sein du centre germinatif. Ceci permet d'avoir des anticorps neutralisants persistants avec une affinité accrue, ce qui préviendrait les réinfections. Le compartiment mémoire spécifique à la protéine S ou au domaine RBD continue d'évoluer et de se renouveler au cours des mois suivant l'infection. Les anticorps exprimés sont issus de processus d'hypermutation somatique<sup>459,460</sup> et ont une capacité neutralisante plus importante.<sup>461-463</sup> Des plasmocytes spécifiques à la protéine S ont été trouvés dans des ponctions de moelle osseuse un an après l'infection par le SARS-CoV-2, et leur abondance est corrélée avec les titres d'anticorps anti-protéine S.<sup>464</sup>

Les protéines S à la surface des particules du virus SARS-CoV-2 et des cellules infectées sont la principale cible des anticorps neutralisants. Le domaine RBD est la cible prédominante des anticorps neutralisants, suivi du domaine NTD. Les anticorps ciblant S2 sont faiblement neutralisants, bien que certains réagissent fortement contre de nombreux virus du sous-genre sarbecovirus.<sup>465,466</sup> Il existe sept groupes majeurs d'anticorps neutralisants anti-RBD (RBD-1 à RBD-7 ; figure 32).<sup>467</sup> Ces anticorps ciblent trois surfaces principales du domaine RBD, à savoir la face supérieure du domaine RBM, la face externe et la face interne cryptique. Les anticorps ciblant la partie RBM sont parmi les anticorps neutralisants les plus puissants contre le SARS-CoV-2 (RBD-1, RBD-2 et RBD-3).<sup>467</sup> Tout en se chevauchant largement dans leurs sites de liaison sur la surface RBM, chaque groupe a une spécificité de liaison. RBD-1 se lie au centre du site de liaison ACE2, tandis que RBD-2 se lie vers le "sommet" et RBD-3 se place vers la surface plane du domaine RBM. Les anticorps ciblant la face externe (RBD-4 et RBD-

5) font partie des anticorps neutralisants les plus larges et les plus puissants contre le SARS-CoV-2.<sup>468</sup> Les anticorps du groupe RBD-4 se lient vers le bord extérieur du RBM et bloquent ACE2, ceux du groupe RBD-5, cependant, ne bloquent pas ACE2, car ils se lient loin du domaine RBM. Les anticorps ciblant la face interne font partie des anticorps récemment classés dans les groupes RBD-6 et RBD-7. Ils sont relativement plus petits en nombre, ont un pouvoir neutralisant plus faible et se lient à des épitopes cryptiques opposés sur la surface externe, accessibles uniquement lorsque le RBD est dans la conformation « up ». Certains anticorps ont besoin d'au moins deux ou trois RBD dans la conformation « up ».<sup>469-471</sup>

Environ un tiers des anticorps dirigés contre le SARS-CoV-2 ciblent la région NTD mais seulement 28,5 % de ces anticorps ont un effet neutralisant.<sup>472</sup> Les anticorps anti-NTD présentent un pouvoir neutralisant plus faible. Ils n'entrent pas en compétition avec le récepteur ACE2 pour la liaison au domaine RBD, mais peuvent impliquer une interférence avec les changements conformationnels requis pour la fusion. Ils auraient également des actions médiées par le récepteur Fc.<sup>473</sup> Les anticorps neutralisants anti-NTD sont classés en trois groupes (NTD-1 à NTD-3, figure 32). Les anticorps NTD-1 se lient sur le côté supérieur de NTD, couvrant l'extrémité N-terminale.<sup>474</sup> Les anticorps NTD-2 se lient sur le côté avant, tandis que les anticorps NTD-3 se lient sur le côté gauche du NTD.<sup>467,475</sup>

Les anticorps non-neutralisants peuvent contribuer à la protection via un mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) et un mécanisme de phagocytose cellulaire dépendante des anticorps. Des activités ADCC sériques élevées ont été observées avec une cinétique similaire aux titres d'anticorps globaux chez des personnes atteintes de COVID-19.<sup>476-480</sup>

La réponse humorale semble protectrice contre le SARS-CoV-2, notamment vis-à-vis d'un risque de réinfection. Cependant, ces anticorps peuvent contribuer à l'exacerbation de la



maladie par un mécanisme de facilitation. À mesure que de nouveaux variants continuent d'émerger, les anticorps neutralisants contre les souches antérieures peuvent perdre leur puissance neutralisante et devenir des anticorps facilitants.<sup>481,482</sup> Ce sont des anticorps non neutralisants qui fixent les virions. Les complexes se lient ensuite au récepteur Fcγ à la surface des macrophages et intériorisent le virus.

Les cellules B mémoires à réaction croisée produites lors d'infections antérieures à coronavirus pourraient contribuer à une réponse humorale rapide (IgG et IgA en particulier) après une primo-infection par le SARS-CoV-2.<sup>483</sup> Des anticorps cross-neutralisant le SARS-CoV et le SARS-CoV-2 ont été observés.<sup>484</sup> De plus, des anticorps IgG anti-protéine S du SARS-CoV-2 ont été détectés dans le sérum des donneurs naïfs d'infection par le SARS-CoV-2<sup>485,486</sup>, probablement en raison d'une réactivité croisée avec les coronavirus humains.<sup>487-489</sup> Ces réactivités croisées sont probablement dues aux anticorps ciblant le domaine S2 hautement conservé de la protéine S, car le domaine S1 est beaucoup moins conservé, probablement en raison de la forte pression sélective exercée par le système immunitaire.<sup>465,466,490</sup> Des titres élevés d'anticorps préexistants à réaction croisée seraient corrélés avec des manifestations cliniques plus légères lors d'une infection par le SARS-CoV-2 dans certaines études<sup>485,486,491</sup>, mais pas dans d'autres.<sup>487</sup> Une autre étude a même montré que les titres d'IgG ciblant la protéine S du virus HCoV-OC43 étaient significativement plus élevés chez les patients atteints d'une maladie grave que chez les patients avec une forme bénigne aux jours 1 à 21 post-infection.<sup>492</sup> Les anticorps à réaction croisée avec une avidité plus faible pourraient entraîner des effets pathogènes en formant un complexe immun antigène-anticorps. Il pourrait également s'agir d'anticorps facilitants.<sup>492</sup>

L'infection par le SARS-CoV-2 entraîne une augmentation marquée des auto-anticorps circulants ciblant un large éventail d'auto-antigènes, notamment les protéines du complément,

les cytokines et les chimiokines<sup>493</sup> en partie à cause de l'inflammation, de la libération d'auto-antigènes liés à la mort cellulaire et du mimétisme moléculaire.<sup>494,495</sup> Des études ont également révélé plusieurs cas de maladies auto-immunes induites par les anticorps après une infection par le SARS-CoV-2, notamment le lupus érythémateux disséminé<sup>496</sup>, le syndrome de Guillain-Barré<sup>497,498</sup> et le syndrome des agglutinines froides.<sup>499,500</sup>

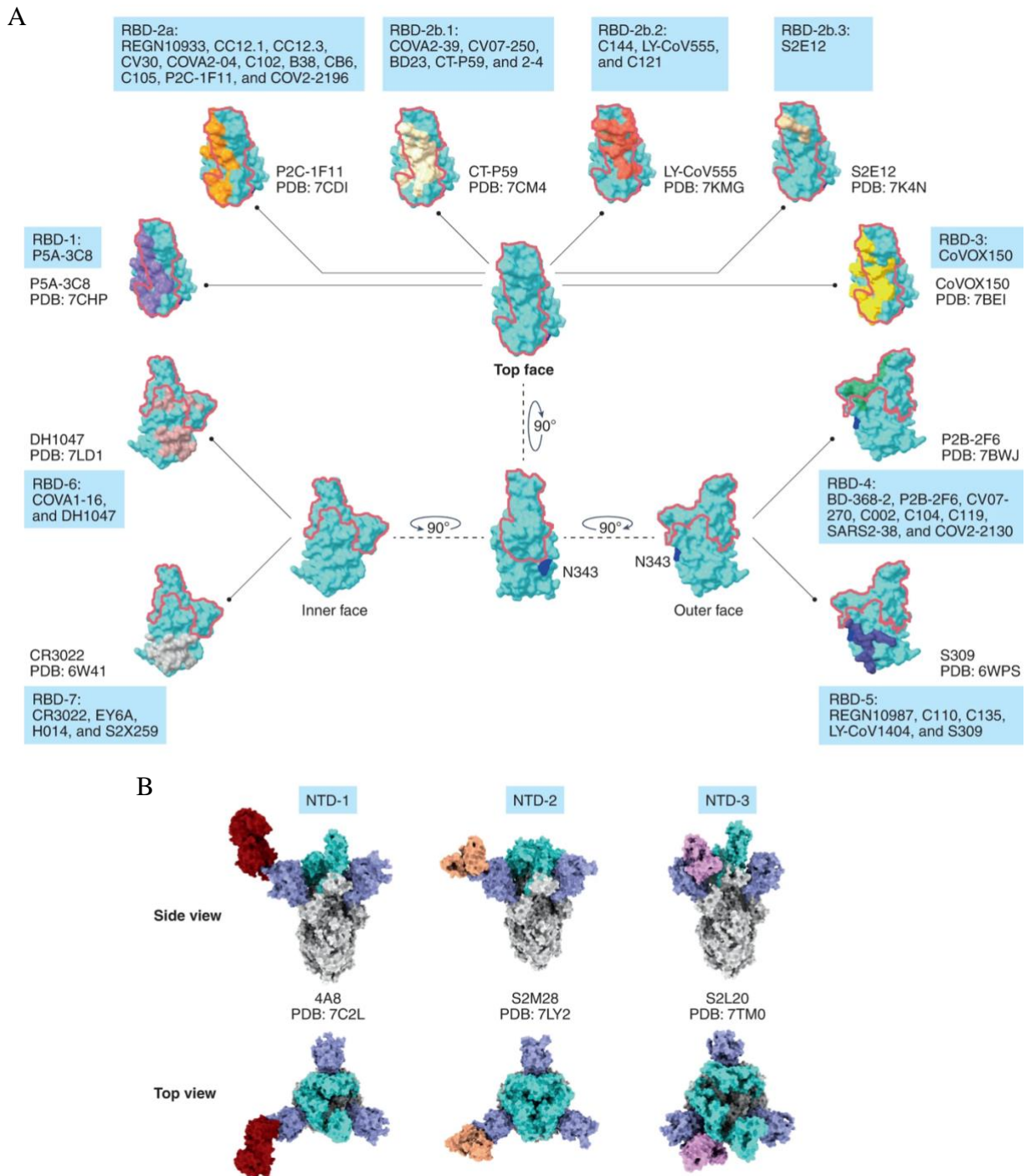


Figure 32. Anticorps neutralisants dirigés contre le SARS-CoV-2

A, Anticorps neutralisants dirigés contre RBD. Pour chaque groupe d'anticorps (RBD-1 à RBD-7), l'empreinte d'un anticorps représentatif sur le domaine RBD est affichée. Le domaine RBM est souligné en rouge ; B, Anticorps neutralisants dirigés contre la région NTD. Pour chaque groupe d'anticorps (NTD-1 à NTD-3), une structure complexe représentative du trimère de protéine S lié par l'anticorps est montrée. RBD est coloré en cyan, NTD en violet et S2 en gris.

## H. Mutation du SARS-CoV-2 et variants d'intérêt

Les mutations du génome du SARS-CoV-2 notamment au niveau de la protéine S sont à l'origine de multiples variants. Les variants ayant un impact démontré sur la santé publique (augmentation de la transmissibilité, de la gravité de l'infection ou encore échappement immunitaire) sont identifiés et qualifiés de variants préoccupants (*variants of concern*, VOC). L'OMS identifie actuellement cinq VOC : alpha, bêta, gamma, delta et omicron.<sup>501</sup> Les lignées Pango pour ces variants sont respectivement B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2 et B.1.1.529.<sup>502</sup> Les caractéristiques des VOC sont présentées dans le tableau III et la figure 33. Ces cinq VOC ont une transmissibilité accrue (avec une infectiosité et/ou une évasion immunitaire augmentées) par rapport à la souche « de type sauvage », en particulier le variant omicron.<sup>503–505</sup> Leur pathogénicité et la mortalité qu'ils engendrent peuvent être similaires, majorées ou diminuées par rapport à la souche sauvage.<sup>506</sup>

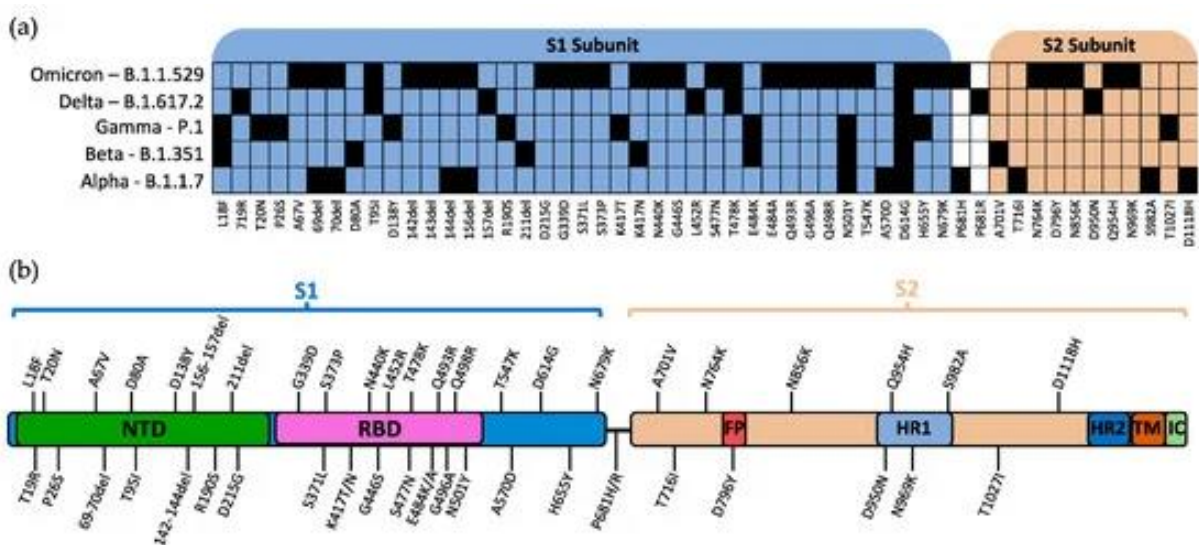


Tableau III. Caractéristiques des principaux variants (adapté de l'ECDC).<sup>506</sup>

Dénomination OMS	Lignage	Mutations d'intérêt de la protéine S	Impact sur la transmission	Impact sur l'immunité	Impact sur la sévérité
Alpha	<u>B.1.1.7</u>	N501Y, D614G, P681H	Augmentée	Similaire	Augmentée
Bêta	<u>B.1.351</u>	K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V	Augmentée	Augmentée	Augmentée
Gamma	<u>P.1</u>	K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y	Augmentée	Augmentée	Augmentée
Delta	<u>B.1.617.2</u>	L452R, T478K, D614G, P681R	Augmentée	Augmentée	Augmentée
Omicron	<u>BA.1</u>	(X)*	Augmentée	Augmentée	Diminuée
Omicron	<u>BA.2</u>	(Y)*	Augmentée	Augmentée	Diminuée
Omicron	<u>BA.4</u>	L452R, F486V, R493Q	Inconnu	Augmentée	Inconnu
Omicron	<u>BA.5</u>	L452R, F486V, R493Q	Inconnu	Augmentée	Inconnu

X\*: A67V, Δ69-70, T95I, G142D, Δ143-145, N211I, Δ212, ins215EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F

Y\*: G142D, N211I, Δ212, V213G, G339D, S371F, S373P, S375F, T376A, D405N, R408S, K417N, N440K, S477N, T478K, E484A, Q493R, Q498R, N501Y, Y505H, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, Q954H, N969K

Le dernier VOC (omicron) a un total de 34 mutations (30 mutations non-synonymes, 3 délétions et 1 insertion) par rapport à la protéine S de type sauvage, représentant 2,5 % de tous les acides aminés présents dans la protéine.<sup>508</sup> Treize des seize mutations RBD associées au VOC sont présentes dans le variant omicron, dont dix se produisent exclusivement dans la séquence

définissant le variant omicron. Il existe plusieurs hypothèses sur l'origine de ce variant. La première hypothèse est que le variant omicron pourrait avoir circulé dans une population avec une surveillance et un séquençage viral insuffisants. La deuxième est qu'omicron ait pu accumuler des mutations chez un hôte non humain, puis s'être propagé à l'Homme. Cinq des mutations déterminantes d'omicron (K417, E484, Q493, Q498 et N501) se trouvent couramment dans les souches de SARS-CoV-2 adaptées à la souris, ce qui suggère que la souche peut avoir initialement évolué chez des animaux (par exemple murin) ensuite a été transmise et a évolué au sein de la population humaine.<sup>509</sup> La troisième possibilité est que le variant omicron pourrait avoir évolué chez un patient infecté chroniquement par le COVID-19, comme un individu immunodéprimé qui a fourni un environnement approprié propice à l'adaptation à long terme du virus. Cette dernière hypothèse est la plus populaire concernant les origines du variant omicron.<sup>510-512</sup> Cette théorie est en outre étayée par le fait que la souche a été identifiée pour la première fois chez un patient immunodéprimé en Afrique du Sud.<sup>513</sup>

La majorité des mutations des VOC se situent au niveau du domaine RBD de la protéine S. De multiples études ont montré une résistance conférée par les mutations RBD vis-à-vis des anticorps issus de sérum humain en post-infection et post-vaccination<sup>504,514,515</sup> De plus, la majorité des mutations dans cette région modifie soit la charge, soit l'hydrophobicité du domaine RBD, augmentant considérablement la probabilité d'évasion aux anticorps par l'intermédiaire d'une affinité modifiée d'épitopes ou des changements conformationnels locaux diminuant l'accessibilité aux épitopes.<sup>507</sup> Ces mutations peuvent aussi avoir un impact considérable sur l'affinité de liaison de la protéine S pour le récepteur ACE2 et, donc, sur l'infectivité du virus. Sur seize mutations qui ont contribué à réduire la neutralisation des virus par les sérums post-vaccinaux, seules sept ont probablement conféré une affinité de liaison accrue de la protéine S pour le récepteur ACE2 (G339D, N440K, L452R, S477N, T478K, E484K et N501Y).

Quatorze des dix-huit mutations qui se produisent dans le NTD des VOC se produisent à proximité dans une région à laquelle se lient presque tous les anticorps neutralisants.<sup>475</sup> Ce qui suggère que la résistance aux anticorps neutralisants (en particulier ceux trouvés dans les sérums post-vaccinés) ciblant le NTD joue un rôle important dans la pression de sélection positive.<sup>507</sup> Cependant, deux mutations fréquentes de la région NTD se produisent en dehors de cette zone : T95I et  $\Delta 69-70$ . Celles-ci n'altéreraient pas la capacité neutralisante des anticorps mais augmenteraient l'infectivité<sup>516,517</sup> Les mutations qui se produisent en dehors des principaux sous-domaines NTD et RBD, dans le domaine S1, influencent également fortement l'infectivité et/ou la sensibilité du SARS-CoV-2 aux anticorps. Les changements d'acides aminés modifient la charge locale et/ou l'hydrophobicité, qualités qui augmentent considérablement la probabilité de modifier la structure locale des protéines et la fonction. La mutation D614G est la plus omniprésente de toutes les mutations SARS-CoV-2 connues de la protéine S, ayant eu lieu dans plus de 99 % de tous les cas séquencés de COVID-19 en 2022. La mutation D614G améliore considérablement l'infectivité du SARS-CoV-2.<sup>518</sup> Elle modifie la conformation du RBD, augmentant son apparition dans un état « up » qui améliore l'affinité de liaison entre S et ACE2, ainsi que l'augmentation de l'accessibilité de la protéine S par la furine.<sup>519</sup> Seules quatre mutations dans la région S2 se produisent couramment dans les VOC du SARS-CoV-2 autres que la récente souche omicron. Deux de ces 4 mutations (D950N et S982A) se situent dans le domaine HR1, ce qui suggère que des mutations dans cette région sont à l'origine d'une pression de sélection positive.<sup>507</sup>

Des mutations dans d'autres gènes pourraient générer des variants avec une infectivité virale, une réplication et un potentiel d'évasion immunitaire accrus.<sup>520,521</sup> Des études récentes ont rapporté que les modifications R203K/G204R de la protéine N sont associées à une réplication, une infectiosité et une transmissibilité virales élevées dans des modèles cellulaires et

animaux.<sup>522,523</sup> Une délétion dans NSP1 ( $\Delta$ 500-532) est liée à de faibles taux plasmatiques d'IFN- $\beta$  et à une charge virale élevée.<sup>524</sup>

## I. Diagnostic

Le diagnostic précoce du COVID-19 permet une prise en charge précoce des patients, notamment à risque de forme sévère. Cela permet aussi d'éviter la propagation du virus dans l'entourage, d'autant que ce dernier pourrait comprendre des personnes à risque. Le diagnostic microbiologique est indiqué chez tous les patients symptomatiques suspects d'infection. Le dépistage de certaines personnes asymptomatiques peut également être important à des fins de santé publique ou de contrôle des infections. Il devra être réalisé en cas de contact étroit avec une personne atteinte de COVID-19, pour l'identification précoce de l'infection dans les établissements de vie collective qui hébergent des personnes à risque de maladie grave, pour le dépistage des patients hospitalisés, avant les interventions chirurgicales ou avant de recevoir un traitement immunosuppresseur.

Le test d'amplification des acides nucléiques, le plus souvent par RT-PCR, pour détecter l'ARN du SARS-CoV-2 des voies respiratoires supérieures est le gold standard.<sup>525</sup> Certains tests ciblent deux gènes ou plus : les gènes de la nucléocapside, de l'enveloppe et de la spike, et des régions ORF dont le gène RdRp.<sup>526</sup> Ils montrent une sensibilité et une spécificité élevées. Dans une méta-analyse, la sensibilité regroupée pour la détection du SARS-CoV-2 à partir de 29 études était de 96,2 % (IC à 95 %, 91,0 % à 98,4 %) et la spécificité était de 98,1 % (IC à 95 %, 95,9 % à 99,2 %).<sup>527</sup> La sensibilité des tests dépend probablement du type et de la qualité de l'échantillon testé, du délai par rapport à l'infection et du test. Les échantillons nasopharyngés, suivis par les échantillons salivaires et nasaux, ont la sensibilité la plus élevée au niveau des voies respiratoires supérieures, alors que la sensibilité des échantillons oropharyngés sur écouvillon est plus faible.<sup>528</sup> Les prélèvements des voies respiratoires inférieures peuvent avoir



des charges virales plus élevées et être plus sensibles que les échantillons des voies respiratoires supérieures.<sup>529</sup> Dans une méta-analyse, la durée moyenne de détection de l'ARN du SARS-CoV-2 dans les voies respiratoires supérieures des patients variait entre 8 à 38 jours et dépendait de la sévérité de la maladie.<sup>530</sup>

Divers tests d'amplification isotherme tels que l'amplification isotherme médiée par boucle (*Loop-mediated isothermal amplification, LAMP*) et l'amplification médiée par la transcription (*transcription-mediated amplification, TMA*) ont également été utilisés. Ces tests d'amplification isotherme sont sensibles et indépendants d'un cycleur thermique, ce qui les rend plus adaptés au développement d'essais rapides, à haut débit et à faible coût.<sup>526</sup>

Certains variants ont un impact sur la capacité à détecter le gène S. Comme la majorité des tests ciblent deux ou trois gènes, la plupart détectent toujours l'ARN du SARS-CoV-2.

Les tests antigéniques permettent de détecter les antigènes du virus, notamment la protéine N. Plusieurs techniques sont utilisées telles que les dosages immuno-enzymatiques (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA*) ou les dosages immunologiques par chimiluminescence (*Chemiluminescence immunoassay, CLIA*). Cependant, la plupart des détections d'antigènes à ce jour ont visé des méthodes permettant des tests rapides et faciles à utiliser, comme l'immunochromatographie (*lateral flow assays, LFA*). Des revues systématiques évaluant les performances des tests antigéniques indiquent qu'ils ont une spécificité très élevée mais sont généralement moins sensibles. Dans une autre étude sur 1098 échantillons appariés obtenus lors de tests sur un campus universitaire, la sensibilité et la spécificité des tests antigéniques relatifs à la RT-PCR étaient de 41 et 98 %, respectivement, chez les personnes asymptomatiques et de 80 et 99 % chez les personnes symptomatiques.<sup>531</sup> Ils peuvent être utiles lorsque les tests de détection d'ARN ne sont pas disponibles ou lorsque les délais d'exécution sont trop longs. La plupart des tests antigéniques ciblent la protéine N. De ce fait, les mutations de la protéine S

n'affecteraient pas la précision de ces tests antigéniques. Le variant omicron possède quatre mutations dans la protéine N mais celles-ci ne semblent pas affecter les performances des tests.<sup>532</sup>

## **J. Prise en charge thérapeutique**

Dans cette section, les traitements spécifiques actuellement recommandés par l'OMS sont présentés. Nous abordons d'abord les traitements des formes asymptomatiques à modérées de COVID-19 puis les formes sévères.

### **1) *Forme asymptomatique à modérée***

Le traitement est indiqué chez les patients adultes atteints de COVID-19 léger à modéré et présentant un risque accru de progression vers une maladie grave (ex. l'âge avancé, une immunodépression, des comorbidités)

#### **(a) Le nirmatrelvir-ritonavir**

Le nirmatrelvir-ritonavir est un traitement oral composé de deux molécules. Le nirmatrelvir bloque l'activité de la protéase MPro et la co-administration avec le ritonavir ralentit le métabolisme du nirmatrelvir afin qu'il reste actif dans l'organisme plus longtemps et à des concentrations plus élevées. La dose est de 300 mg de nirmatrelvir associés à 100 mg de ritonavir deux fois par jour pendant 5 jours. Il doit être initié dès que possible après le diagnostic de COVID-19 et dans les cinq jours suivant l'apparition des symptômes.

Dans l'essai randomisé EPIC-HR qui comprenait 2 246 patients adultes non vaccinés présentant au moins un facteur de risque de COVID-19 grave, le nirmatrelvir-ritonavir, administré dans les trois jours suivant l'apparition des symptômes, a réduit le risque d'hospitalisation ou de décès à 28 jours de 89 % par rapport au placebo (0,7 % contre 6,5 %, différence de risque = -5,8, [IC95 % : -7,8 à -3,8]).<sup>533</sup> Dans une étude observationnelle incluant plus de 180 000 adultes israéliens (vaccinés et non vaccinés) avec un test SARS-CoV-2 positif et des facteurs de risque

de progression vers une maladie grave, le traitement par nirmatrelvir-ritonavir a été associé à une diminution de la progression vers une maladie grave ou un décès à 28 jours par rapport à l'absence de traitement (Hazard ratio, [HR] = 0,54 [IC95 % : 0,39-0,75]).<sup>534</sup> Cette étude a été réalisée au moment où le variant omicron était prédominant, ce qui suggère que le nirmatrelvir-ritonavir conserve son efficacité contre ce variant.

La dose doit être adaptée à la fonction rénale. Le nirmatrelvir-ritonavir est à la fois un inhibiteur des enzymes métaboliques tels que l'enzyme CYP3A (principalement en raison du ritonavir) ainsi qu'un substrat du CYP3A. Cela rend son utilisation difficile chez les patients transplantés traités par des inhibiteurs des calcineurines ou des inhibiteurs de mTOR. L'interaction entre le ritonavir et les médicaments dépendants du CYP3A peut entraîner une augmentation de l'aire sous la courbe et des concentrations sanguines de ces derniers entre 1,8 et 20 fois.<sup>535</sup> Cela peut entraîner des effets secondaires dangereux de ces immunosuppresseurs, notamment une toxicité rénale, des convulsions ou un PRES syndrome (encéphalopathie postérieure réversible). Les sociétés savantes recommandent une utilisation prudente avec une adaptation posologique chez cette population.<sup>534,536</sup>

#### (b) Remdesivir

Le remdesivir, un analogue nucléotidique qui inhibe l'ARN polymérase du SARS-CoV-2, est une autre option de traitement. Il est administré à raison de 200 mg IV le 1<sup>er</sup> jour, suivi de 100 mg IV par jour pendant deux jours. Il doit être initié dès que possible après le diagnostic et dans les sept jours suivant l'apparition des symptômes. Dans un essai contrôlé randomisé de 562 patients ambulatoires non vaccinés ( $\geq 12$  ans avec au moins un facteur de risque de progression vers une maladie grave ou  $\geq 60$  ans) atteints de COVID-19 léger à modéré, l'initiation d'un traitement IV de trois jours par le remdesivir dans les sept jours d'apparition des symptômes a réduit le risque d'hospitalisation liée au COVID-19 de 87 % par rapport au placebo (HR = 0,13 ;

[IC95 % : 0,03-0,59]). Aucun décès n'a été enregistré dans les deux groupes de l'étude. Bien que ces données ne puissent pas montrer un bénéfice sur la mortalité, une réduction des hospitalisations reste un résultat important pour les patients ainsi qu'une considération importante pour les systèmes de santé débordés.<sup>537</sup>

### (c) Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux anti-SARS-CoV-2 sont également une alternative thérapeutique. De nombreux anticorps monoclonaux ou association d'anticorps tels que le casirivimab-imdevimab et le bamlanivimab-etesevimab ou LY-CoV555 ont montré un bénéfice dans des essais randomisés avec une réduction du risque d'hospitalisation ou de décès associé au COVID-19 chez ces patients d'environ 70 à 85 % par rapport au placebo.<sup>538-541</sup>

Cependant, les anticorps monoclonaux ont une activité variable contre les différents variants du SARS-CoV-2, et la sélection des agents doit tenir compte de la sensibilité des variants en circulation. Actuellement, seul le bebtelovimab, qui n'est pas disponible en Europe, est efficace contre les variants omicron actuels BA.4/BA.5. L'association tixagevimab+cilgavimab conserve une activité partielle contre ces variants.<sup>504,542</sup>

### (d) Molnupiravir

Le molnupiravir est un analogue nucléosidique qui inhibe la réplication du SARS-CoV-2. La dose recommandée est de 800 mg (quatre gélules de 200 mg) prises par voie orale toutes les 12 heures pendant cinq jours. Il doit être initié dès que possible après le diagnostic de COVID-19 et dans les cinq jours suivant l'apparition des symptômes. Aucun ajustement posologique n'est nécessaire en fonction de l'insuffisance rénale ou hépatique. Le molnupiravir a réduit le risque d'hospitalisation ou de décès d'environ 31 % (risque relatif [RR] = 0,69 [IC95 % : 0,48-1,01]) par rapport au placebo. Ce qui tendait vers la signification statistique sans l'atteindre.<sup>543</sup> En France, l'accès précoce à ce traitement n'a pas été autorisé.<sup>544</sup>

## 2) *Formes sévères*

### (a) **Dexaméthasone**

La dexaméthasone est recommandée pour les patients traités par de l'oxygène ou une assistance ventilatoire.<sup>545</sup> Une dose de 6 mg par jour pendant 10 jours est recommandée. Dans deux méta-analyses portant sur 1703 et 138 345 patients, les glucocorticoïdes avaient réduit la mortalité chez les patients atteints de COVID-19 sévère et n'étaient pas associés à un risque accru d'événements indésirables graves.<sup>546,547</sup> En revanche, aucun bénéfice n'a été observé chez les patients qui n'avaient pas besoin d'oxygène ou d'assistance ventilatoire.<sup>548</sup>

### (b) **Baricitinib et les inhibiteurs de JAK**

Le baricitinib est un inhibiteur de Janus kinase (JAK) utilisé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Il agit sur le SRC qui implique des voies de transduction du signal médiées par JAK. Le baricitinib inhibe sélectivement (et de manière réversible) JAK1/JAK2, interrompant la synthèse de l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10, IFN-gamma et le facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages. En plus des effets immunomodulateurs, il aurait des effets antiviraux potentiels par interférence avec l'entrée virale via la voie de l'endocytose.<sup>549</sup> L'OMS recommande le baricitinib en association avec la dexaméthasone chez les patients présentant un COVID-19 sévère. Le baricitinib est administré à raison de 4 mg par voie orale une fois par jour pendant 14 jours maximum. Il n'est pas recommandé chez les adultes dont le débit de filtration glomérulaire estimé est  $\leq 15$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup>. Une réduction de dose est recommandée chez les patients dont le débit de filtration glomérulaire estimé est  $\leq 60$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>.<sup>545</sup> Une méta-analyse de dix essais randomisés montre une réduction de mortalité de 20 % à 28 jours avec un traitement inhibiteur de JAK.<sup>550</sup>

### (c) **Anti-IL-6 et le tocilizumab**

Le tocilizumab inhibe le récepteur de l'IL-6. La production d'IL-6 endogène est induite par des stimuli inflammatoires et conduit à une variété de réponses immunologiques. L'IL-1 $\beta$  et le

TNF $\alpha$ , en particulier, sont les principaux activateurs de l'expression de l'IL-6. Une libération excessive d'IL-6 peut provoquer une tempête de cytokines, les niveaux d'IL-6 étant proportionnels à la gravité du SRC.<sup>551</sup> Un inhibiteur de l'IL-6 (tocilizumab ou sarilumab) empêcherait les actions de l'IL-6 en l'empêchant de se fixer à son récepteur. L'OMS recommande l'utilisation d'un inhibiteur de l'IL-6 (tocilizumab ou sarilumab), en association avec un corticostéroïde, chez les patients atteints d'un COVID-19 sévère. Deux méta-analyses d'essais randomisés portant sur des patients hospitalisés pour COVID-19 montrent que la mortalité toutes causes confondues était plus faible chez ceux qui recevaient du tocilizumab par rapport au placebo ou au traitement standard.<sup>552,553</sup> Plusieurs autres essais n'ont pas réussi à identifier un avantage en termes de mortalité ou un autre avantage clinique clair avec ces agents.<sup>554,555</sup> Une des hypothèses pouvant expliquer cette différence est que les essais qui ont suggéré un bénéfice avec le tocilizumab ont rapporté des taux de mortalité globale légèrement plus élevés par rapport aux autres essais, reflétant potentiellement des populations plus gravement malades. Certains des essais négatifs peuvent également manquer de puissance statistique.

Un bloqueur des récepteurs de l'IL-6 et le baricitinib ne doivent pas être administrés ensemble et doivent être considérés comme des alternatives.

### **K. Vaccin anti-SARS-CoV-2**

Neuf vaccins sont approuvés par l'OMS et utilisés dans le monde.<sup>556</sup> D'autres vaccins sont largement utilisés mais non approuvés à l'heure actuelle par l'OMS comme le vaccin Gam-COVID-Vac. L'ensemble des vaccins actuellement utilisés reposent sur l'immunogénicité de la protéine S soit seule, soit associée à d'autres protéines virales présentes dans la particule virale dans le cas d'un virus inactivé. La protéine S est la cible principale des anticorps neutralisants. La puissance de ces anticorps dépend des interactions de haute affinité avec des

parties spécifiques de la structure tridimensionnelle complexe de la protéine S dans une conformation native.<sup>557</sup>

Les vaccins anti-COVID-19 actuels sont divisés en deux catégories. La première catégorie comprend les vaccins à ARNm et à vecteur adénoviral. Ils possèdent le matériel génétique pour la biosynthèse de la protéine S dans les cellules de la personne vaccinée. Avec ce type de vaccins, la conception spécifique de séquences génétiques pour la formation et la présentation de la protéine S correctement repliée est au premier plan. La deuxième catégorie englobe les vaccins à base de protéines, c'est-à-dire les vaccins classiques à virus entier inactivé et les vaccins sous-unitaires, qui contiennent la protéine S en combinaisons avec des adjuvants. Il est nécessaire que le trimère de la protéine S ait une conformation semblable à celle du virus afin d'induire une réponse neutralisante efficace. Cette conformation peut être perturbée lors de la fabrication de vaccins conventionnels ou lorsque la protéine est exprimée dans les cellules du patient vacciné après vaccination avec un vaccin à ARNm ou à vecteur adénoviral. Certains fabricants ont introduit des mutations stabilisatrices destinées à empêcher la conversion structurelle par inadvertance de la protéine S labile. Pour stimuler l'immunité adaptative, en plus de l'immunogène spécifique de l'agent pathogène, un vaccin nécessite un adjuvant. Ce dernier stimule le système immunitaire inné et fournit le deuxième signal nécessaire à l'activation des lymphocytes T. Pour les vaccins possédant un matériel génétique, ce matériel peut servir à la fois d'immunogène et d'adjuvant, en raison des propriétés immunostimulantes intrinsèques de l'ARN et de l'ADN qui activent le système immunitaire inné. Les vaccins à base de protéines possèdent des adjuvants propres.<sup>558</sup>

## 1) *Types de vaccins*

### (a) Vaccins possédant du matériel génétique

#### (i) Vaccins à ARNm

Les vaccins à ARN contiennent des ARNm entièrement fonctionnels qui peuvent être traduits directement en protéine S. Les deux vaccins à ARNm actuellement largement utilisés sont Comirnaty (BioNTech-Pfizer) et Spikevax (Moderna). Ils contiennent des séquences optimisées en codons pour une expression efficace de l'ensemble de la protéine S.<sup>559</sup> Les vaccins à ARNm sont constitués de complexes lipidiques sous la forme de nanoparticules lipidiques, qui non seulement offrent une protection contre la dégradation de l'ARNm dans les tissus, mais facilitent également l'absorption cellulaire et la libération dans le cytoplasme pour la traduction de l'ARNm (figure 34).<sup>560</sup> Les composants utilisés comprennent des phospholipides, du cholestérol, des lipides cationiques spéciaux (ionisables) et du polyéthylène glycol (PEGylés).<sup>561</sup>

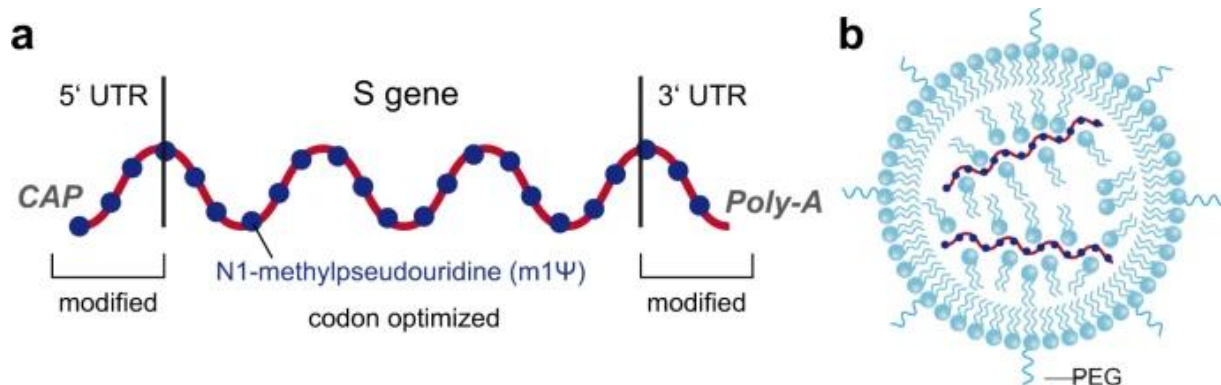


Figure 34. Vaccin anti-SARS-CoV-2 à ARNm.

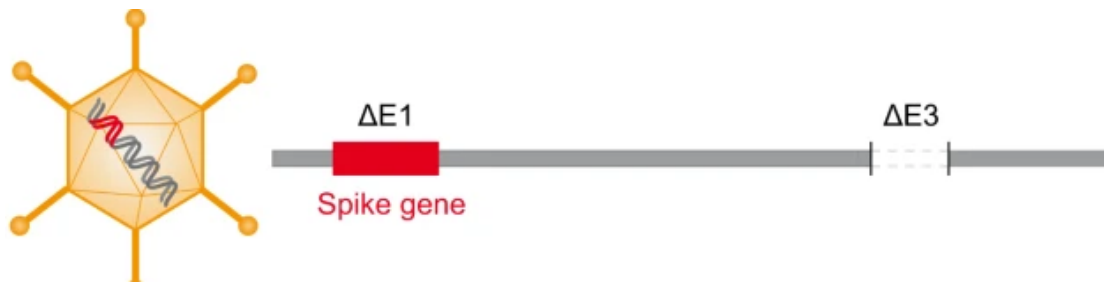
A, Vaccin à ARNm schématisé. UTR—région non traduite. B, Schéma d'une nanoparticule lipidique utilisée pour l'administration de vaccins à ARNm. PEG—polyéthylène glycol. D'après Heinz *et al.*<sup>561</sup>



## (ii) Vaccins à vecteur adénovirus

Actuellement, quatre principaux vaccins à vecteur viral sont utilisés : Convidecia (CanSino Biological Inc./Beijing Institute of Biotechnology), Janssen (Johnson & Johnson), Vaxzevria (Oxford-AstraZeneca) et Gam-COVID-Vac (The Gamaleya Institute Moscow). Ils utilisent comme vecteurs des dérivés de différents adénovirus : Convidecia - adénovirus humain 5<sup>562</sup>, Janssen - adénovirus humain 26<sup>563</sup>, Vaxzevria - adénovirus de chimpanzé Y25<sup>564</sup> ; Gam-COVID-Vac - adénovirus humain 26 pour la première dose et adénovirus humain 5 pour la seconde.<sup>565</sup> Dans l'ensemble de ces vaccins, le gène E1 de l'adénovirus est remplacé par le gène codant la protéine S. La perte du gène E1 inhibe la possibilité de réplication du vecteur. De plus, il y a une délétion du gène E3 dans l'ensemble de ces vaccins.<sup>561</sup> Ces vaccins vont produire la protéine S native dans les cellules du patient vacciné (figure 35). L'ADN adénoviral se dirige dans le noyau où il reste extra-chromosomique. Il nécessite la transcription en ARNm puis une traduction en utilisant la machinerie cellulaire. Seulement de rares cas d'épissage aberrant ou d'utilisation du site de polyadénylation ont été observés.<sup>566</sup> Ceci est essentiel car pendant la réplication du SARS-CoV-2, le transcrite de la glycoprotéine S, comme tous les transcrits du SARS-CoV-2, sont fabriqués dans le cytoplasme en l'absence de machinerie d'épissage et de polyadénylation de l'hôte. L'épissage alternatif pourrait conduire à la formation d'une protéine S tronquée en C-terminal et donc soluble. De telles formes sécrétées pourraient se lier aux cellules endothéliales exprimant l'ACE2 et pourraient contribuer aux événements thrombotiques via un mécanisme médié par les anticorps, comme observé après la vaccination avec les vaccins à vecteur adénoviral COVID-19.<sup>567</sup> Une immunité préexistante contre les vecteurs peut altérer la réponse vaccinale.<sup>568</sup> Or, la séroprévalence contre l'adénovirus est importante dans la population.<sup>569</sup> De plus, tous les vaccins à vecteur adénoviral sont susceptibles d'induire des réponses immunitaires contre les particules vectorielles mais les conséquences ne sont pas encore connues.

A



B

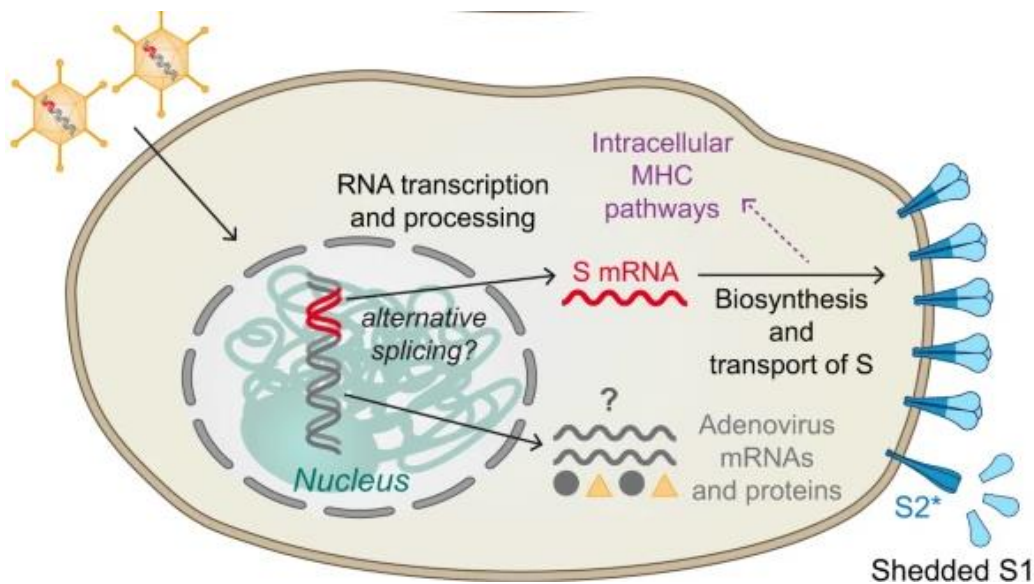


Figure 35. Vaccin anti-SARS-CoV-2 à vecteur adénovirus.

A, Représentation d'une particule de vaccin à vecteur adénoviral. E1 et E3 : gènes précoces d'adénovirus 1 et 3 ; B, Expression de la protéine S dans les cellules des individus vaccinés. Une perte plus ou moins importante de la partie S1 et la conversion de S2 en sa structure post-fusion (S2\*) peuvent se produire en l'absence de mutations stabilisatrices. D'après Heinz *et al.*<sup>561</sup>

(b) Vaccins à base de protéines

(i) Vaccins inactivés

Trois vaccins à virus entier inactivés sont autorisés : Covilo (Sinopharm), Covaxin (Bharat Biotech) et CoronaVac (Sinovac). Pour ces trois vaccins, le virus est cultivé dans des cellules Vero et inactivé par la bêta-propiolactone.<sup>561,570</sup>

## (ii) Vaccins sous-unitaires

Il s'agit du vaccin NVX-CoV2373 (Novavax). Il se compose de la protéine S trimérique pleine longueur qui est produite sous forme de protéine recombinante dans les cellules d'insectes *Spodoptera frugiperda* à l'aide d'un système d'expression de baculovirus et contient des mutations pour stabiliser S2 (K986P et V987P) ainsi que pour supprimer le site de clivage de la furine (682-RRAS-685 remplacé par QQAQ).<sup>571</sup> Ce vaccin contient un adjuvant à base de saponine.<sup>561</sup>

### 2) Réponse immunitaire aux différents vaccins

Il a été constaté que les vaccins à ARNm COVID-19 induisent la maturation des lymphocytes T CD4+ et CD8+ et la majorité des personnes vaccinées ont des réponses des lymphocytes T mémoires. Il s'agit d'une réponse de type Th1.<sup>572,573</sup> La réponse neutralisante de ces vaccins était également robuste. Des réponses importantes et persistantes au niveau du centre germinatif spécifiques à la protéine S stimulées par les vaccins à ARNm COVID-19 étaient fortement corrélées à la production d'anticorps neutralisants.<sup>574,575</sup> Les titres élevés d'anticorps neutralisants ont été détectés chez les adultes six mois après avoir reçu la deuxième dose.<sup>576</sup>

Les vaccins à base de vecteur viral induisent des réponses lymphocytaires T spécifiques de la protéine S. Cette réponse est de profil Th1.<sup>577,578</sup> Ces vaccins présentent également une réponse neutralisante importante.<sup>565,579</sup>

Les vaccins inactivés ont également un taux de séroconversion important proche de 100 %.<sup>571</sup> Par contre, les résultats des essais cliniques de phase I/II de CoronaVac ont montré de faibles réponses des lymphocytes T spécifiques du SARS-CoV-2 exprimant l'IFN $\gamma$ , suggérant une réponse des lymphocytes T type Th2.<sup>580</sup>

Concernant le vaccin NVX-CoV2373, il présente également une réponse humorale importante avec un fort taux de séroconversion. L'évaluation des réponses cellulaires a montré des réponses

de cellules T CD4+ polyfonctionnelles spécifiques à l'antigène avec la production d'IFN- $\gamma$ , d'IL-2 et de TNF- $\alpha$  lors de la stimulation de la protéine S. Une réponse lymphocytaire Th1 a été observée.<sup>571</sup>

Une étude récente a comparé la réponse immunitaire de quatre vaccins (Spikevax, Comirnaty, NVX-CoV2373 et Janssen) jusqu'à 6 mois après la vaccination dans une cohorte de 102 patients. L'ensemble des patients présentaient des anticorps neutralisants. Six mois après l'immunisation, des titres d'anticorps neutralisants diminuaient progressivement pour les vaccins Spikevax, Comirnaty et NVX-CoV2373. Les titres étaient plus élevés pour le vaccin Spikevax, suivi dans l'ordre par les vaccins Comirnaty, NVX-CoV2373 et Janssen. L'ensemble des individus ayant bénéficié de l'un des quatre vaccins présentaient une réponse lymphocytaire T CD4+ spécifique. Alors que la cinétique des anticorps neutralisants était différente entre les vaccins à ARNm et à vecteur viral, la cinétique de réponse des lymphocytes T CD4+ était similaire entre les quatre vaccins. La hiérarchie de l'ampleur des lymphocytes T CD4+ mémoires était la suivante Spikevax > Comirnaty et NVX-CoV2373 > Janssen. Les deux vaccins à ARNm et Janssen ont induit des réponses de cellules T CD8+ comparables. Comme attendu pour un vaccin à base de protéines, les taux des lymphocytes T CD8+ après NVX-CoV2373 étaient inférieurs à ceux des autres vaccins.<sup>581</sup>

### 3) *Impact des VOC sur les différents vaccins*

L'ensemble des vaccins actuellement utilisés sont affectés par les VOC, car ils sont tous produits à partir des souches originales de type sauvage de la phase précoce de la pandémie. Les sérums des personnes vaccinées conservent la capacité de neutraliser le variant alpha, bien qu'avec un effet légèrement réduit.<sup>582,583</sup> Des tests de neutralisation utilisant des sérums de patients ayant eu le vaccin Vaxzevria ont montré une réduction de plus de 86 fois de l'activité de neutralisation contre le variant bêta.<sup>584</sup> Après une vaccination par les vaccins Spikevax,

Cominrnaty et Covilo la réduction était beaucoup plus faible mais importante allant de 1,6 à 8,6.<sup>585</sup> Concernant le variant gamma, l'efficacité et la capacité de neutralisation ont été diminuées de 6,7 et 4,5 fois avec les vaccins Cominrnaty et Spikevax, respectivement.<sup>585</sup> Vis-à-vis du variant delta, Planas *et al.* ont montré que 95 % des patients vaccinés généraient des anticorps neutralisants contre le variant delta, mais la neutralisation était 3 fois plus faible après le vaccin Cominrnaty et 5 fois plus faible après le vaccin Vaxzevria que contre le variant alpha.<sup>515</sup> Le variant omicron est caractérisé par un échappement important à la suite de la vaccination. La neutralisation d'omicron par les sérums des vaccinés est réduite de 20 à 85 fois.<sup>586-588</sup> Cependant, les patients qui ont reçu une dose supplémentaire ont présenté une neutralisation efficace.<sup>586,588</sup> De plus, entre 70 % et 80 % des lymphocytes T CD4+ et CD8+ post-vaccination par le vaccin Cominrnaty ou Janssen avaient une activité contre le variant omicron. La réponse T générée après une vaccination présente une activité croisée importante.<sup>589</sup>

Depuis début septembre 2022, les vaccins bivalents souche sauvage/variant BA.1 sont autorisés en Europe et aux États-Unis. Ces vaccins sont des versions adaptées des vaccins originaux Comirnaty (Pfizer/BioNTech) et Spikevax (Moderna).<sup>590,591</sup> Une dose de rappel à l'aide de ces vaccins génèreraient une meilleure activité neutralisante contre les différents sous-variants d'omicron (dont les variants actuels BA.4 et le BA.5) par rapport à une dose de rappel d'un vaccin classique, selon les données préliminaires de plusieurs études randomisées.<sup>592,593</sup>

## **II. Conclusions et objectifs du travail de thèse concernant le SARS-CoV-2**

Le SARS-CoV-2 a été à l'origine d'une pandémie mondiale qui a impacté l'ensemble de la population avec une surmortalité importante. Dans cette revue de la littérature, nous avons décrit le virus, son impact clinique dans la population, son évolution ainsi que l'évolution des thérapeutiques préventives et curatives. Depuis l'émergence du virus, l'élaboration de stratégies préventives et curatives de lutte contre le SARS-CoV-2 a permis d'améliorer le pronostic global du COVID-19. Néanmoins, les populations immunodéprimées sont plus vulnérables face à ce virus. Dans ce travail de thèse, nous nous intéressons à l'impact du SARS-CoV-2 dans la population des transplantés rénaux. En effet, face aux infections, ces patients immunodéprimés ont une susceptibilité plus importante, des tableaux cliniques qui peuvent être plus graves et une réponse aux thérapeutiques qui est différente de celle observée chez les individus immunocompétents. Ce travail concernant le SARS-CoV-2 chez le transplanté rénal s'articule en trois grandes parties. Dans la première partie, nous décrivons les caractéristiques du COVID-19 et nous étudierons les facteurs de risque de sévérité et de mortalité, notamment l'impact du syndrome de relargage cytokinique. Dans la seconde partie, nous étudierons la réplication virale et la réponse sérologique à court et moyen termes chez le transplanté rénal infecté. Enfin, dans la troisième partie, nous étudierons la réponse vaccinale jusqu'à 4 doses de vaccins anti-SARS-CoV-2 ainsi que les facteurs de risque de mauvaise réponse vaccinale.

### **III. Les biomarqueurs du syndrome de relargage cytokinique prédisent la gravité et la mortalité de la maladie due au COVID-19 chez les transplantés rénaux**

#### **A. Rationnel de l'étude**

En Alsace, les transplantés rénaux ont été fortement impactés par le COVID-19 lors de la première vague. Un rassemblement religieux en Alsace en février 2020 a été à l'origine d'une première vague de COVID-19 précoce et intense dans la région. Les patients transplantés rénaux n'ont pas été épargnés et à ce moment-là, aucune donnée n'était publiée dans la littérature. La morbi-mortalité dans cette population semblait importante et cela a été confirmé par la suite par les données de registres, notamment le registre français.<sup>594</sup> Chez l'immunocompétent, les cas de COVID-19 sévère étaient caractérisés par une phase précoce de réplication du virus suivie d'une phase ultérieure indépendante du virus et immunodépendante. Cette dernière s'accompagne d'une composante inflammatoire exacerbée et est à l'origine du SRC décrit en introduction. L'évolution clinique du COVID-19 était généralement plus sévère chez les patients présentant des comorbidités.<sup>595</sup> Dans ce contexte, les transplantés rénaux présentent une vulnérabilité particulière, en raison de leurs nombreuses comorbidités, laissant présager de manifestations graves pouvant conduire au décès. Cependant, l'impact de l'immunosuppression sur l'évolution clinique du COVID-19 était controversé. D'une part, les traitements immunosuppresseurs pourraient favoriser la réplication virale mais, d'autre part, l'immunosuppression pourrait atténuer ou même prévenir l'apparition de l'hyperinflammation induite par le SARS-CoV-2. L'étude monocentrique que nous avons menée avait comme premier objectif la caractérisation de la présentation du COVID-19 dans une population de transplantés rénaux. Nous avons également étudié les facteurs de risques de sévérité et de mortalité du COVID-19 chez le transplanté rénal, notamment l'impact des biomarqueurs du SRC.

## **B. Principaux résultats**

### **1) *Caractéristiques des patients***

Au total, 49 adultes transplantés rénaux atteints de COVID-19 ont été inclus entre le 4 mars et le 7 avril 2020. Conformément aux données de la littérature publiée au moment de l'étude, la sévérité de la maladie a été classée comme suit : (1) maladie bénigne gérée en ambulatoire, (2) maladie non sévère nécessitant une hospitalisation mais sans besoin d'oxygénothérapie ou avec un besoin en oxygène maximal < 6 L/min, et (3) maladie sévère nécessitant une hospitalisation avec un besoin en oxygène > 6 L/min ou une ventilation mécanique. Parmi les 49 patients, 8 (16,3 %) ont été pris en charge en ambulatoire, tandis que 41 (83,7 %) ont nécessité une hospitalisation. Chez ces derniers, un COVID-19 non sévère a été diagnostiqué chez 21 (51,2 %) patients tandis que 20 (48,8 %) patients présentaient un COVID-19 sévère. Quatorze (34,2 %) transplantés ont été admis aux soins intensifs ou en réanimation après un intervalle médian de 9,5 jours depuis l'apparition des symptômes (EI : 7,5 à 11,8 jours). Parmi eux, 11 se sont améliorés après la ventilation mécanique. Trois cas ayant des besoins importants en oxygène (> 6 L/mn) n'étaient pas éligibles à l'admission en réanimation en raison de leur âge avancé et des comorbidités qu'ils présentaient. Le nombre de patients décédés a été de neuf, permettant d'évaluer le taux de mortalité à 30 jours à 19,5 %.

### **2) *Facteurs associés au COVID-19 grave et au décès***

Les patients avec un tableau clinique sévère étaient plus fréquemment âgés de plus de 60 ans (85 % versus 42,9 %,  $p = 0,01$ ) et étaient plus fréquemment obèses (70 % versus 33,3 %,  $p = 0,02$ ). En ce qui concerne les symptômes, ils présentaient plus fréquemment une dyspnée (100 % versus 42,9 %,  $p < 0,0001$ ) et moins fréquemment une diarrhée (60 % versus 90,5 %,  $p = 0,03$ ).



À l'admission, les patients avec un tableau clinique sévère présentaient des taux de CRP, d'IL-6, de polynucléaires neutrophiles et de hs (hypersensible)-troponine I plus élevés alors que la PaO<sub>2</sub> était plus faible. Les marqueurs inflammatoires étaient associés à la gravité de la maladie. L'analyse de la courbe ROC a révélé que le pic d'IL-6 était fortement associé à la fois au COVID-19 sévère (AUC = 0,921, p < 0,0001 ; figure 36 A) et à la mortalité (AUC = 0,821, p = 0,015). Le pic d'IL-6, qui s'est produit entre le J7 et le J19 après l'admission, était nettement plus élevé chez les patients atteints d'une forme sévère de la maladie (figure 36 B). De plus, les taux sanguins des marqueurs de l'inflammation (IL-6 au seuil de 65 ng/L et la CRP au seuil de 100 mg/L) étaient associés à la sévérité du COVID-19 ainsi qu'à la mortalité liée au COVID-19 (figure 36 C-F).

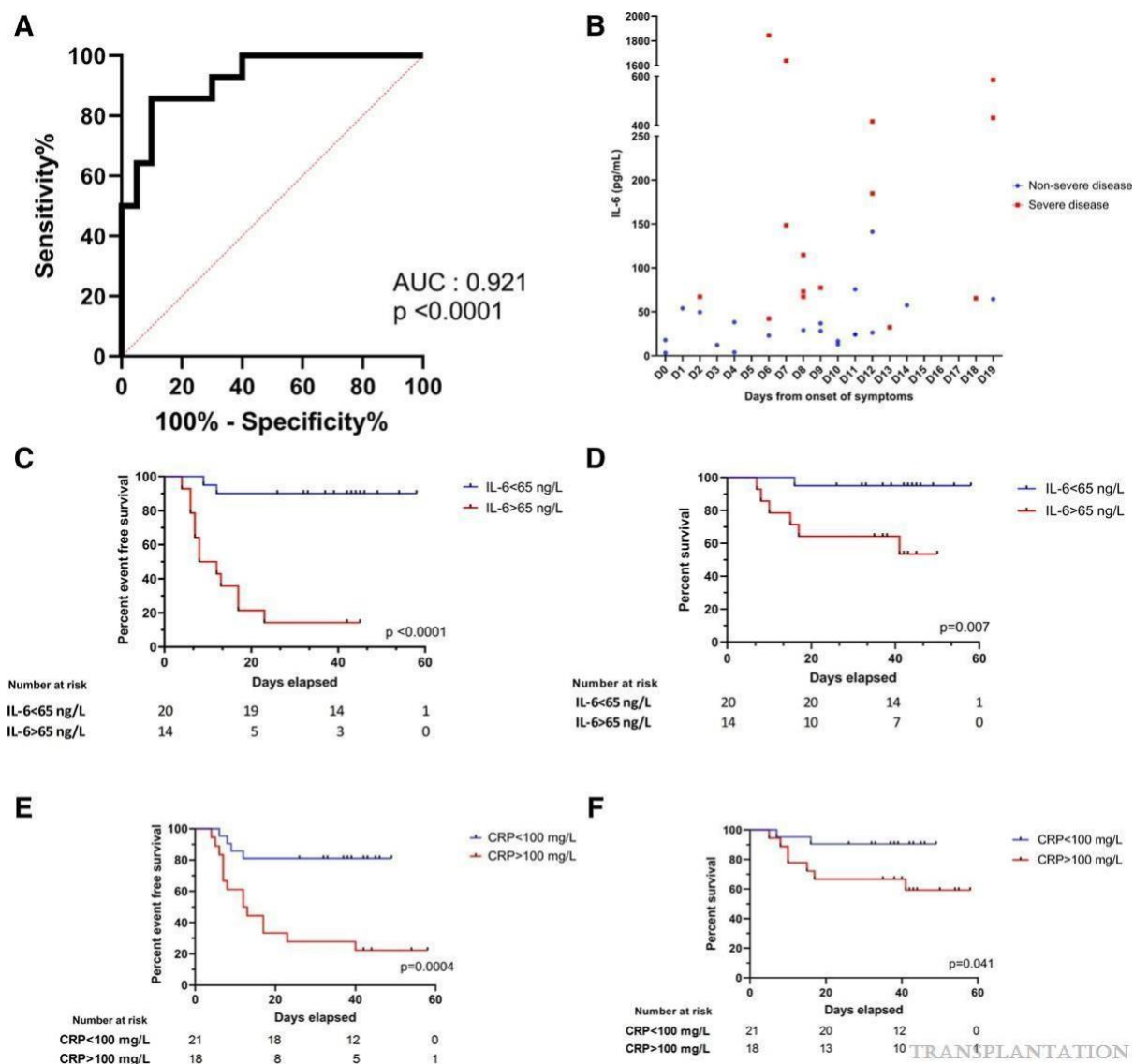


Figure 36. Associations entre les marqueurs inflammatoires sanguins et la sévérité ainsi que la mortalité du COVID-19.

A, Courbe ROC de la gravité du COVID-19 en fonction des taux sériques IL-6. AUC = 0,921,  $p < 0,0001$  ; B, Diagramme de dispersion des niveaux d'IL-6 (valeurs maximales) par rapport aux jours suivant l'apparition des symptômes chez les patients classés en fonction de la sévérité du COVID-19 ; C, Courbes de Kaplan-Meier de la survie sans COVID-19 sévère selon les taux d'IL-6. IL-6 > 65 ng/L (courbe rouge) vs IL-6 < 65 ng/L (courbe bleue),  $p < 0,0001$  ; D, Courbes de Kaplan-Meier de la survie selon les niveaux d'IL-6. IL-6 > 65 ng/L (courbe rouge) vs IL-6 < 65 ng/L (courbe bleue),  $p = 0,007$  ; E, Courbes de Kaplan-Meier de la survie sans COVID-19 sévère selon les niveaux de protéine C-réactive (CRP). CRP > 100 mg/L (courbe rouge) vs CRP < 100 mg/L (courbe bleue),  $p = 0,0004$  ; F, Courbe de Kaplan-Meier de la survie selon les niveaux de CRP. CRP > 100 mg/L (courbe rouge) vs CRP < 100 mg/L (courbe bleue),  $p = 0,041$ .

Les marqueurs de lyse cellulaire ont montré des associations similaires. L'analyse de la courbe ROC a révélé que les taux de hs-troponine I étaient associés à la mortalité (AUC = 0,920,  $p = 0,0002$ ). De plus, les taux des marqueurs de lyse cellulaire (hs-troponine I au seuil de 30 ng/L et de LDH au seuil de 300 UI/L) étaient associés à la sévérité du COVID-19 ainsi qu'à la mortalité liée au COVID-19 (figure 37 A–D).

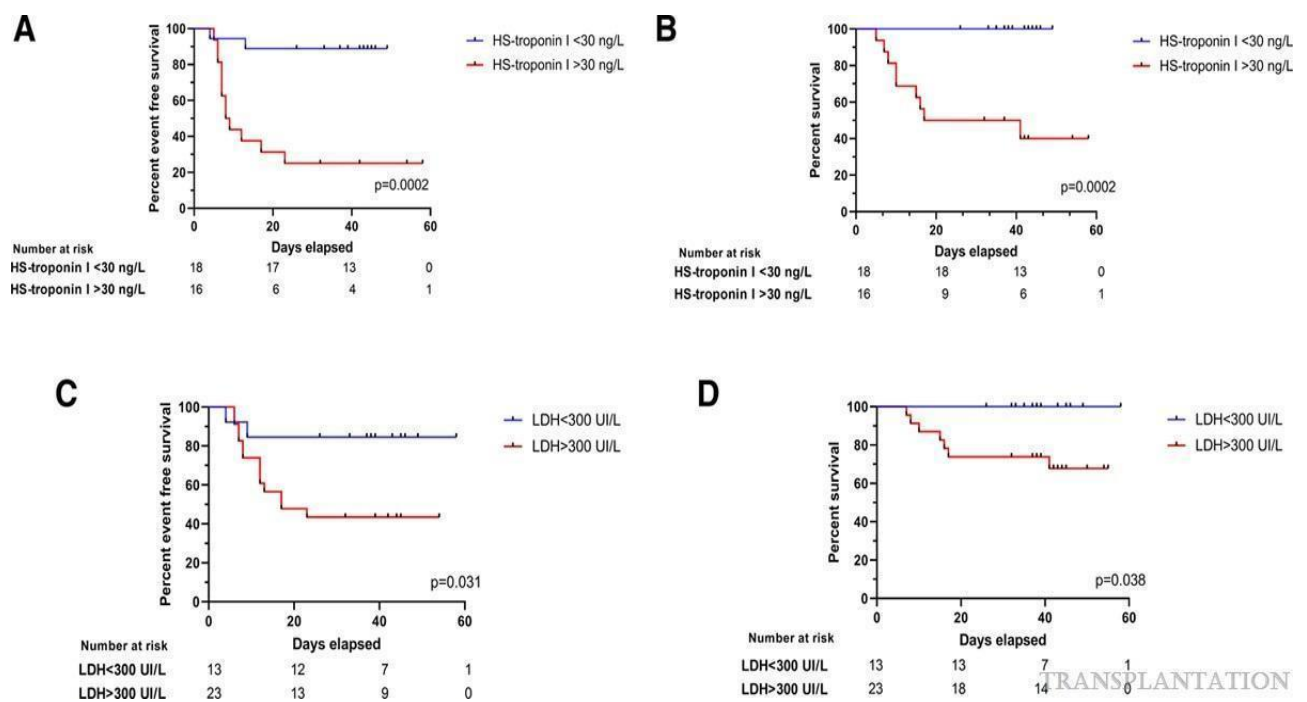


Figure 37. Associations entre les marqueurs sanguins de lyse cellulaire et la sévérité ainsi que la mortalité du COVID-19.

A, Courbes de Kaplan-Meier de la survie sans COVID-19 sévère selon les niveaux de haute sensibilité (hs)-troponine I. Hs-troponine I > 30 ng/L (courbe rouge) vs hs-troponine I < 30 ng/L (courbe bleue),  $p = 0,0002$  ; B, Courbes de Kaplan-Meier de la survie selon les niveaux de hs-troponine I. Hs-troponine I > 30 ng/L (courbe rouge) vs hs-troponine I < 30 ng/L (courbe bleue),  $p = 0,0002$  ; C, Courbe de Kaplan-Meier la survie sans COVID-19 sévère selon les niveaux de lactate déshydrogénase (LDH). LDH > 300 UI/L (courbe rouge) vs LDH < 300 UI/L (courbe bleue),  $p = 0,031$  ; D, Courbe de Kaplan-Meier de la survie selon les niveaux de LDH. LDH > 300 UI/L (courbe rouge) vs LDH < 300 UI/L (courbe bleue),  $p = 0,038$ .

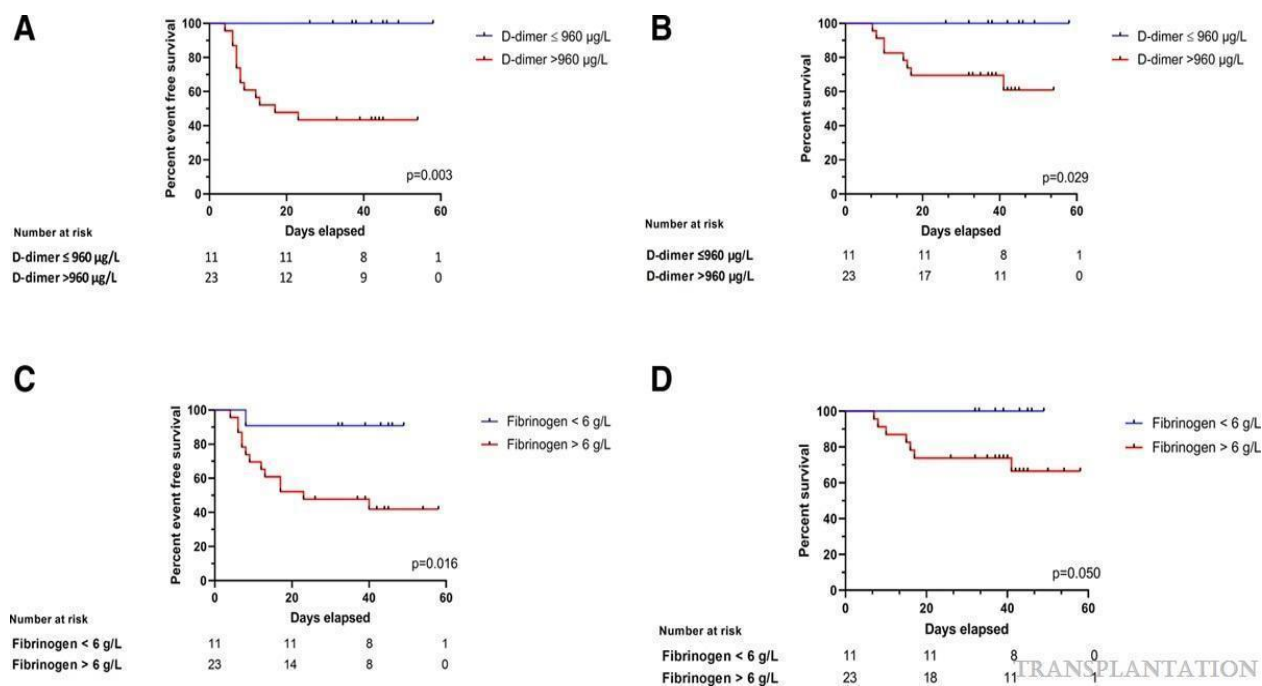


Figure 38. Associations entre les marqueurs sanguins de coagulation et la sévérité ainsi que la mortalité du COVID-19.

A, Courbes de Kaplan-Meier de la survie sans COVID-19 sévère selon les niveaux de D-dimères. D-dimères > 960 µg/L (courbe rouge) vs D-dimères ≤ 960 µg/L (courbe bleue),  $p = 0,003$  ; B, Courbes de Kaplan-Meier de la survie selon les niveaux de D-dimères. D-dimères > 960 µg/L (courbe rouge) vs D-dimères ≤ 960 µg/L (courbe bleue),  $p = 0,029$  ; C, Courbes de Kaplan-Meier de la survie sans COVID-19 sévère selon les niveaux de fibrinogène. Fibrinogène > 6 g/L (courbe rouge) vs fibrinogène < 6 g/L (courbe bleue),  $p = 0,016$  ; D, Courbes de Kaplan-Meier de la survie selon les niveaux de fibrinogène. Fibrinogène > 6 g/L (courbe rouge) vs fibrinogène < 6 g/L (courbe bleue),  $p = 0,05$ .

En ce qui concerne les paramètres de coagulation, les taux de fibrinogène (seuil : 6 g/L) et des D-dimères (seuil : 960 ng/mL) étaient associés à la sévérité du COVID-19 ainsi qu'à la mortalité liée au COVID-19 (figure 38 A–D). Aucun des patients avec des taux de hs-troponine I < 30 ng/L ( $n = 18$ ), LDH < 300 UI/L ( $n = 13$ ), D-dimères < 960 ng/mL ( $n = 11$ ) et fibrinogène < 6 g/L ( $n = 11$ ) n'est décédé du COVID-19.

Nos données indiquent que les biomarqueurs de l'inflammation, des lésions cardiaques et de la coagulopathie ont tous une signification pronostique dans cette entité clinique.

## C. Principaux points de discussion

Lors de la première vague de COVID-19, il était urgent de caractériser davantage l'évolution clinique et de stratifier le pronostic de COVID-19 dans les populations fragiles telles que les transplantés rénaux. Nous avons donc mené une première étude pour tenter de résoudre ces problématiques.

Dans notre étude, les transplantés rénaux avec le COVID-19 étaient fréquemment âgés de plus de 60 ans et avaient d'importantes comorbidités. La présentation clinique était similaire à celle rapportée dans la population générale, la fièvre et la toux étant les 2 signes cliniques les plus fréquents.<sup>334,596</sup> Cependant, la présence de diarrhée dans notre population était aussi fréquente que la toux (73,5 %) et sa prévalence était nettement plus élevée que celle décrite pour la population générale (3,8 % à 24 %).<sup>334,596</sup> D'autres séries publiées ont rapporté une prévalence élevée de symptômes gastro-intestinaux chez les transplantés (17 % à 55 %). Les patients transplantés d'organe solide présentent de façon générale un risque élevé de troubles gastro-intestinaux, qui peuvent être exacerbés par les médicaments immunosuppresseurs.

Le taux de mortalité du COVID-19 dans notre cohorte était de 16 % après un suivi médian de 34 jours (mortalité à 30 jours chez les patients hospitalisés : 19,5 %). Ce résultat est cohérent avec de nombreux rapports sur les transplantés d'organes solides faisant état d'un taux de mortalité de 9 à 46 %, la plupart se situant entre 18 et 30 % lors de la première vague de COVID-19. Il est plus élevé par rapport à ce qui a été rapporté dans la population générale (1 % à 14 %).<sup>597,598</sup> Les données d'une très grande cohorte de 17 millions de patients ont indiqué que les receveurs d'organes avaient un risque de décès ajusté 3,55 fois plus élevé.<sup>346</sup>

Une observation intéressante de notre étude montre que les biomarqueurs inflammatoires (IL-6 et CRP) prédisent la mortalité et sont liés aux formes sévères de COVID-19 chez les patients transplantés rénaux. Ces résultats indiquent un rôle clé des médiateurs pro-inflammatoires et du SRC dans la pathogenèse du COVID-19 sévère - Nous avons identifié un seuil optimal d'IL-

6 de 65 ng/L pour prédire la maladie sévère et la mortalité - une valeur cohérente avec celle précédemment signalée comme étant associée à une insuffisance respiratoire (80 ng/L) chez les immunocompétents.<sup>599</sup> La hs-troponine I, un biomarqueur spécifique des lésions myocardiques, peut également servir de marqueur précoce de la gravité de la maladie et de la mortalité. Ceci est cohérent avec la présence d'une atteinte cardiaque chez environ 20 % des patients hospitalisés atteints de COVID-19 lors de la première vague.<sup>600,601</sup> Les mécanismes de l'implication cardiaque dans le COVID-19 sont multiples : lésions du tissu cardiaque médiées par les cytokines, déséquilibre entre l'apport et la demande d'oxygène, lésion ischémique due à une thrombose micro et/ou macrovasculaire, dysfonctionnement endothélial et troubles du myocarde, atteinte causée par l'invasion directe du SARS-CoV-2 dans les cardiomyocytes.<sup>387,602</sup>

Les D-dimères sont un biomarqueur connu du COVID-19 sévère. Il reflète un risque thrombotique élevé.<sup>341</sup> Nous avons constaté que l'IL-6 augmentait au début de la maladie sévère, tandis que les D-dimères atteignaient un pic dans la maladie grave. De plus, nous avons identifié une corrélation entre l'IL-6 et les D-dimères dans le COVID-19, une association qui reflète un lien potentiel entre l'inflammation et la thrombose. Des niveaux accrus d'IL-6 ont déjà été associés à l'hypercoagulation<sup>603</sup>, à la thrombose veineuse profonde<sup>604</sup>, et aux maladies cardiovasculaires.<sup>605</sup> L'IL-6 est également capable d'induire l'agrégation et l'adhésion plaquettaires.<sup>606</sup>

Ces résultats montrent que la gravité du COVID-19 chez les receveurs de rein semble être davantage liée au SRC favorisé par les comorbidités. Ils ont été confirmés à plus grande échelle dans les données du registre français.<sup>607</sup> D'un autre côté, l'effet de l'immunosuppression sur la sévérité du COVID-19 est encore débattu.<sup>597</sup> Les agents immunosuppresseurs, tels que les inhibiteurs de la calcineurine, les antimétabolites et les glucocorticoïdes, pourraient théoriquement être bénéfiques par un effet inhibiteur de la réplication virale observé *in vitro*.<sup>597</sup>

Des études comparant les résultats cliniques du COVID-19 chez les patients transplantés à des cohortes appariées de patients non transplantés présentant des comorbidités similaires ont montré une gravité similaire de l'infection et de la mortalité.<sup>608,609</sup> L'étude du registre français comparant des transplantés rénaux à une cohorte de non transplantés ayant le COVID-19 a montré, dans une analyse multivariée, qu'être transplanté n'était pas indépendamment associé à la mortalité, alors que l'âge > 60 ans, les maladies cardiovasculaires, la dyspnée, la fièvre et le taux de créatinine > 115  $\mu\text{mol/L}$  ont été retenus comme des facteurs de risque indépendants de décès. Nombreuses de ces études concluent que l'immunosuppression à long terme ne semble pas augmenter le risque de développer des formes sévères de COVID-19 ; cependant, il convient de souligner que dans presque toutes ces études, le traitement immunosupresseur était diminuée lorsque les transplantés étaient hospitalisés, bien que de manière différente selon les études.

Les résultats de notre étude ont indiqué que, chez les transplantés rénaux atteints de COVID-19, des élévations des marqueurs biochimiques de l'inflammation, des lésions cardiaques et de la coagulation sont associées à une plus grande gravité et à une survie moins favorable. Ces données nous ont permis d'identifier les patients les plus à risque de complications liées au COVID-19 et d'adapter notre prise en charge, dans un contexte de tension hospitalière durant les vagues successives de COVID-19.

La méthodologie, les résultats et la discussion détaillés de l'étude se trouvent dans la publication ci-dessous.

# Biomarkers of Cytokine Release Syndrome Predict Disease Severity and Mortality From COVID-19 in Kidney Transplant Recipients

Ilies Benotmane, MD,<sup>1,2,3</sup> Peggy Perrin, MD,<sup>1,3</sup> Gabriela Gautier Vargas, MD,<sup>1</sup> Xavier Bassand, MD,<sup>1</sup> Nicolas Keller, MD,<sup>4</sup> Thomas Lavaux, MD,<sup>5</sup> Mickael Ohana, MD,<sup>6</sup> Dimitri Bedo,<sup>1</sup> Clément Baldacini,<sup>1</sup> Mylene Sagnard,<sup>1</sup> Dogan-Firat Bozman, MD,<sup>1</sup> Margaux Della Chiesa,<sup>1</sup> Noëlle Cognard, MD,<sup>1</sup> Jérôme Olagne, MD,<sup>1</sup> Héloïse Delagrevier, MD, PhD,<sup>2</sup> David Marx, MD,<sup>1</sup> Françoise Heibel, MD,<sup>1</sup> Laura Braun, MD,<sup>1</sup> Bruno Moulin, MD, PhD,<sup>1,3</sup> Samira Fafi-Kremer, MD, PhD,<sup>2,3</sup> and Sophie Caillard, MD, PhD<sup>1,3</sup>

**Background.** Data on coronavirus disease 2019 (COVID-19) in immunocompromised kidney transplant recipients (KTR) remain scanty. Although markers of inflammation, cardiac injury, and coagulopathy have been previously associated with mortality in the general population of patients with COVID-19, their prognostic impact amongst KTR with severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) infection has not been specifically investigated. **Methods.** We conducted a cohort study of 49 KTR who presented with COVID-19. Clinical and laboratory risk factors for severe disease and mortality were prospectively collected and analyzed with respect to outcomes. The study participants were divided into 3 groups: (1) mild disease manageable in an outpatient setting (n = 8), (2) nonsevere disease requiring hospitalization (n = 21), and (3) severe disease (n = 20). **Results.** Gastrointestinal manifestations were common at diagnosis. The 30-day mortality rate in hospitalized patients was 19.5%. Early elevations of C-reactive protein (>100 mg/L) and interleukin-6 (>65 ng/L) followed by increases in high-sensitivity troponin I (>30 ng/L) and D-dimer (>960 ng/mL) were significantly associated with severe disease and mortality. Viral load did not have prognostic significance in our sample, suggesting that outcomes were chiefly driven by a cytokine release syndrome (CRS). **Conclusions.** Regular monitoring of CRS biomarkers in KTR with COVID-19 is paramount to improve clinical outcomes.

(*Transplantation* 2021;105: 158–169).

## INTRODUCTION

Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) is a zoonotic beta-coronavirus that emerged from China in December 2019 and rapidly gave rise to a pandemic.<sup>1,2</sup> Coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by SARS-CoV-2 has lower mortality than other diseases caused by related betacoronavirus strains – that is, SARS;

caused by SARS-CoV and Middle East respiratory syndrome (MERS; caused by MERS-CoV). Unfortunately, the crude death toll of COVID-19 is already higher than that attributable to SARS and MERS combined<sup>3</sup> because SARS-CoV-2 has more rapid human-to-human spread.<sup>4</sup>

The clinical course of COVID-19 is generally more severe in elderly subjects and patients with comorbid conditions.<sup>5</sup> However, the manifestations and prognosis of the disease in fragile immunocompromized patients

Received 30 July 2020. Revision received 28 August 2020.

Accepted 30 August 2020.

<sup>1</sup> Department of Nephrology and Transplantation, University Hospital, Strasbourg, France.

<sup>2</sup> Department of Virology, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France.

<sup>3</sup> INSERM U1109, LabEx TRANSPLANTE, Strasbourg, France.

<sup>4</sup> Department of Nephrology and Dialysis, University Hospital, Strasbourg, France.

<sup>5</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, University Hospital, Strasbourg, France.

<sup>6</sup> Department of Radiology, University Hospital, Strasbourg, France.

I.B. and G.G.V. responsible for data collection and interpretation; statistical analysis; article writing. P.P. involved in data collection and interpretation; article writing. X.B., N.K., D.B., C.B., M.S., D.B., D.C., and B.M. participated in clinical management and data collection. N.C., J.O., H.D., D.M., F.H., and L.B. involved in data collection. T.L. and S.F.K. participated in laboratory testing. M.O. involved

in computed tomography image interpretation. S.C. participated study design and supervision; data collection and interpretation; article writing.

S.C. reports personal fees and nonfinancial support from Novartis, nonfinancial support from Sanofi, nonfinancial support from Astellas, all unrelated to the current study. M.O. reports personal fees from Canon Medical Systems, unrelated to the current study. I.B. and P.P. contributed equally to this work. All other authors have no conflicts of interest to disclose as described by Transplantation.

Supplemental digital content (SDC) is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text, and links to the digital files are provided in the HTML text of this article on the journal's Web site ([www.transplantjournal.com](http://www.transplantjournal.com)).

Correspondence: Ilies Benotmane, MD, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 1 Pl de l'hôpital, Strasbourg, Bas-Rhin 67091, France. ([ilies.benotmane@chru-strasbourg.fr](mailto:ilies.benotmane@chru-strasbourg.fr)).

Copyright © 2020 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 0041-1337/21/1051-158

DOI: 10.1097/TP.0000000000003480



remain poorly investigated. In this context, kidney transplant recipients (KTR) may be particularly vulnerable to severe manifestations and death because of their high comorbidity burden (ie, hypertension, diabetes, and cardiovascular disease). However, the impact of immunosuppression on the clinical course of COVID-19 remains controversial.<sup>6</sup> On the one hand, immunosuppressive drugs could promote viral replication but, on the other hand, immunosuppression may mitigate or even prevent the onset of SARS-CoV-2-induced hyperinflammation. There is indeed mounting evidence that a dysregulated inflammatory response is pathophysiologically linked to the hallmark features of COVID-19 – including the acute respiratory distress syndrome (ARDS) and the cytokine release syndrome (CRS).<sup>7</sup> The occurrence of CRS in patients with COVID-19 – as reflected by increased interleukin (IL)-6 serum levels – is clinically associated with respiratory failure, ARDS, and severe outcomes.<sup>8</sup> Elevated serum levels of C-reactive protein (CRP) are also a marker of severe betacoronavirus infections.<sup>9,10</sup> However, the occurrence and prognostic impact of CRS in immunocompromised KTR with COVID-19 remains unclear.

This single-center study conducted in a well-characterized cohort of KTR from Alsace, Grand-Est, France, was designed to address this issue. Specifically, biomarkers of CRS were investigated in relation to the occurrence of severe COVID-19 and mortality.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Population

The study sample consisted of 49 adult KTR with COVID-19 who were recruited in our transplant center between March 4 and April 7, 2020. COVID-19 was diagnosed in patients with clinical symptoms and positive reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) results on nasopharyngeal swab specimens and/or typical lung lesions on chest computed tomography (CT). Patients presenting with fever, flu-like or respiratory symptoms, anosmia/ageusia, digestive disorders, and a known personal contact with a confirmed case were considered highly suspected for COVID-19. In accordance with the published literature,<sup>11-13</sup> disease severity was categorized as follows: (1) mild disease manageable in an outpatient setting, (2) nonsevere disease requiring hospitalization but without oxygen requirement or oxygen need <6 L/min, and (3) severe disease requiring hospitalization with an oxygen need >6 L/min or mechanical ventilation. Data were retrieved from digital medical records from the day of admission to the date of the last follow-up (April 30, 2020). The following variables were collected: patient characteristics, symptoms and time of presentation, immunosuppressive therapy and management, laboratory parameters, chest CT findings, and administered drugs. High-dose steroids included methylprednisolone or dexamethasone. The main study outcomes were as follows: death, intensive care unit (ICU) admissions, acute kidney injury (AKI), graft loss, venous thromboembolic events, as well as neurological and myocardial complications. Ethical approval was granted by the local Institutional Review Board (approval number: DC-2013-1990).

### Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2 Infection

Laboratory identification of SARS-CoV-2 was performed by RT-PCR testing of nasopharyngeal swab specimens according to current guidelines (Institut Pasteur, Paris, France; WHO technical guidance).<sup>14</sup> The assay targets 2 regions of the viral RNA-dependent RNA polymerase (*RdRp*) gene, and the threshold limit of detection was 10 copies per reaction.

### Serum Laboratory Markers

Laboratory follow-up examinations in hospitalized patients were performed in a standardized fashion. CRP, procalcitonin, lactate dehydrogenase (LDH), high-sensitivity (hs)-troponin I, D-dimer, and fibrinogen were measured with standard techniques. Serum IL-6 levels were quantified with a chemiluminescent immunoassay (Lumipulse G600 II; Fujirebio, Tokyo, Japan).<sup>15</sup> A total of 132 specimens underwent IL-6 quantification (80 prospectively and 52 retrospectively using stored serum samples). All laboratory parameters were measured on admission and the peak values observed within the first 3 weeks of symptom onset were recorded. Routine biological monitoring was generally performed every 2 days during hospitalization. However, this time interval was modifiable at the physician's discretion (ie, more or less frequently) by taking into account the clinical course of COVID-19 for each patient. Lymphopenia was defined as a lymphocyte count <1000/mm<sup>3</sup>, eosinopenia as an eosinophil count <50/mm<sup>3</sup>, and thrombocytopenia as a platelet count <150 000/mm<sup>3</sup>.

### Chest CT Imaging

When clinically feasible, all patients underwent chest CT imaging on admission. Repeated CT scans were performed when clinically indicated as it has been suggested that chest CT may have a higher sensitivity than RT-PCR.<sup>16</sup> All CT images were interpreted by a single experienced chest radiologist. Typical CT findings—consisting of bilateral ground-glass opacities with peripheral distribution—were graded according to the European Society of Radiology and the European Society of Thoracic Imaging guidelines,<sup>17</sup> as follows: no lesion, minimal lesions (<10%), moderate lesions (10–25%), important lesions (25–50%), severe lesions (50–75%), and critical lesions (>75%).

### Statistical Analysis

Continuous data are given as medians and interquartile ranges (IQR) and analyzed with the Mann-Whitney *U* test. Categorical variables are expressed as counts and percentages and compared with the Fisher exact test. The associations between hypoxia and laboratory markers of inflammatory markers, cell lysis, and coagulation were determined by calculating Spearman's correlation coefficients ( $\rho$ ). Receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed to investigate serum biomarker levels in relation to disease severity and COVID-19-related mortality. Kaplan-Meier plots of severe COVID-19-free survival and COVID-19-specific survival were constructed according to levels of inflammation markers (CRP and IL-6), cell lysis markers (LDH, hs-troponin I), and coagulation markers (D-dimer, fibrinogen). Comparisons of Kaplan-Meier curves were performed with the log-rank test. Severe COVID-19 was defined as oxygen requirement >6 L/min,

need for ICU admission, or patient death. Patients were censored on the date of the last follow-up (April 30, 2020). All calculations were performed with GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). Two-tailed *P* values <0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

### General Characteristics of KTR With COVID-19

The general characteristics of the 49 KTR included in the study are shown in Table 1. Eight (16.3%) were managed in outpatient facilities, whereas 41 (83.7%) required hospitalization. Most patients were Caucasian (*n* = 48, 98%), men (*n* = 37, 75.5%), and aged >60 years (*n* = 27, 55.1%). Hypertension was the most common comorbidity (*n* = 41, 83.7%), followed by diabetes (*n* = 23, 46.9%), and obesity (*n* = 22, 44.9%). The median interval between transplantation and the onset of COVID-19 symptoms was 7.1 years (IQR: 2.9–14.4 y). At the time of COVID-19 diagnosis, the following immunosuppressive drugs were being used: calcineurin inhibitors (CNI), *n* = 42 (85.8%); mycophenolate mofetil (MMF) or mycophenolic acid (MPA), *n* = 38 (77.6%); and mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors, *n* = 11 (22.5%). The most common symptom at diagnosis was fever (*n* = 42, 85.7%), followed by cough (*n* = 28, 57.1%) and diarrhea (*n* = 27, 55.1%). Nineteen patients (38.8%) had dyspnea.

### KTR With COVID-19 Who Did Not Require Hospitalization

Of the 8 KTR who did not require hospitalization, COVID-19 was confirmed by RT-PCR in 5 cases and seroconversion in 2 patients. The remaining case presented with highly suggestive clinical symptoms (ie, fever, anosmia/ageusia, respiratory, and digestive symptoms). Table 1 compares the general characteristics of patients who required hospitalization versus those who did not. Those in the latter group were younger and had a lower body mass index. Moreover, they less frequently received MMF/MPA (37.5% versus 85.4%, respectively, *P* = 0.01) but were more commonly treated with mTOR inhibitors (62.5% versus 14.6%, respectively, *P* = 0.01). Symptoms were milder, with a lower occurrence of fever and dyspnea.

### KTR With COVID-19 Who Required Hospitalization

Most of the hospitalized patients (*n* = 41) were men (78.0%), aged >60 years (63.4%), and obese (51.2%). Interestingly, diarrhea (75.6%) occurred as frequently as cough (70.7%; Table 2). A total of 39 (95.1%) patients had an RT-PCR-confirmed diagnosis and 2 (4.9%) had highly suspected clinical symptoms and imaging results. Laboratory findings are illustrated in Table 3. Lymphopenia (*n* = 30/38, 79%) and eosinopenia were common on admission (*n* = 32/35, 91.4%), whereas 9 patients (22%) showed thrombocytopenia. Median serum creatinine levels were 166 μmol/L (IQR: 130–231 μmol/L).

A total of 31 (75.6%) patients had a CT (median interval from symptom onset: 7 d; IQR: 4–10 d). Lesions affecting >50% of the lung parenchyma were observed in 13 patients (42%; Figure S1, SDC, <http://links.lww.com/TP/C20>).

With regard to the management of immunosuppression on admission (Table 4), MMF/MPA and mTOR inhibitors were withdrawn in all patients. Scheduled belatacept administration was delayed in 1 of 2 cases. CNI were temporarily withdrawn in 15 (36.6%) patients. Treatment for COVID-19 consisted of hydroxychloroquine in 15 (36.6%) and azithromycin in 26 (65%) patients, respectively (Figure 1). Lopinavir–ritonavir was given to 5 patients only because of significant pharmacokinetic interactions with CNI and mTOR inhibitors. High-dose corticosteroids were used to treat CRS in 14 cases (46.7%) who required oxygen therapy and in 9 patients before progression to severe stage. In the latter group, 5 had favorable outcomes and 4 progressed to the severe stage (of whom 2 required mechanical ventilation and 1 died of disease). The anti-IL-6 receptor monoclonal antibody tocilizumab was used in 4 patients. Of them, 3 patients showed a rapid improvement whereas 1 died 6 days after injection. The individual clinical outcomes in relation to the temporal course of inflammatory markers and COVID-19 treatments are illustrated in Figures S2a (CRP) and S2b (IL-6), SDC, <http://links.lww.com/TP/C20>.

Fourteen (34.2%) patients were admitted to ICU after a median interval from symptom onset of 9.5 days (IQR: 7.5–11.8 d; Table 5). Of them, 11 improved following mechanical ventilation. Three cases with severe oxygen needs were not eligible for ICU admission because of advanced age and a significant burden of comorbidities. AKI was frequent (75.6%) but generally completely reversible (73.9%). There were no cases of graft loss. Other complications included mild-to-severe neurological manifestations (*n* = 16), deep vein thrombosis (*n* = 1), and myocarditis (*n* = 1). Nine patients died (Table 5) and the 30-day mortality rate was 19.5% (Figure S3, SDC, <http://links.lww.com/TP/C20>).

### Factors Associated With Severe COVID-19 and Death

Among hospitalized patients, nonsevere and severe COVID-19 was diagnosed in 21 (51.2%) and 20 (48.8%) patients, respectively. Of the latter group, oxygen therapy ≥6 L/min or mechanical ventilation was required on admission and at follow-up (between 1 and 15 d from admission) in 4 and 16 patients, respectively. The general characteristics of patients with nonsevere and severe COVID-19 are shown in Table 2. Severe patients were more frequently aged >60 years (85% versus 42.9%, respectively, *P* = 0.01) and were more commonly obese (70% versus 33.3%, respectively, *P* = 0.02). With regard to symptoms, dyspnea was more frequent (100% versus 42.9%, respectively, *P* < 0.0001) and diarrhea less common in severe than in nonsevere patients (60% versus 90.5%, respectively, *P* = 0.03).

On admission, severe patients had higher CRP, IL-6, and hs-troponin I levels, an increased neutrophil count, and a lower PaO<sub>2</sub> (Table 3). There were no intergroup differences with regard to D-dimer, procalcitonin, LDH, creatinine levels, lymphocyte count, and SARS-CoV-2 nasopharyngeal viral load.

We next sought to investigate the temporal course of laboratory parameters—by taking into account their peak values—in relation to the clinical evolution of COVID-19. Peak levels of CRP were significantly higher in KTR

**TABLE 1.****Demographic and clinical characteristics of hospitalized and nonhospitalized patients at admission and during follow-up**

	Entire cohort (n = 49)	Nonhospitalized (n = 8)	Hospitalized (n = 41)	P
Men	37 (75.5%)	5 (62.5%)	32 (78%)	0.39
Age (y)	62.2 (52.3–67.8)	53.1 (50.8–57.7)	63.9 (55.2–69)	0.02
>60 y	27 (55.1%)	1 (12.5%)	26 (63.4%)	0.02
Comorbidities				
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28 (23–32)	23 (21.8–26.5)	30 (24–33)	0.05
<25 kg/m <sup>2</sup>	17 (34.7%)	5 (62.5%)	12 (29.3%)	0.08
25–30 kg/m <sup>2</sup>	10 (20.4%)	2 (25%)	8 (19.5%)	
>30 kg/m <sup>2</sup>	22 (44.9%)	1 (12.5%)	21 (51.2%)	
Cardiovascular disease	18 (36.8%)	1 (12.5%)	17 (41.5%)	0.23
Respiratory disease	9 (18.4%)	0	9 (22%)	0.32
Obstructive sleep apnea	7 (14.3%)	0	7 (17.1%)	0.58
Diabetes	23 (46.9%)	4 (50%)	19 (46.3%)	1
Active cancer	1 (2%)	1 (12.5%)	0	0.16
Hypertension	41 (83.7%)	7 (87.5%)	34 (82.9%)	1
RAAS inhibitor use	21 (42.9%)	6 (75%)	15 (36.6%)	0.06
ACE inhibitor use	12 (24.5%)	3 (37.5%)	9 (22%)	0.39
ARB use	9 (18.4%)	3 (37.5%)	6 (14.6%)	0.15
ABO blood group system				0.06
A	28 (58.3%)	5 (62.5%)	23 (57.5%)	
B	6 (12.5%)	3 (37.5%)	3 (7.5%)	
O	12 (25%)	0	12 (29.3%)	
AB	2 (4.2%)	0	2 (4.9%)	
Primary nephropathy				0.2
Diabetic nephropathy	6 (12.2%)	3 (37.5%)	3 (7.3%)	
Chronic tubulointerstitial disease	10 (20.4%)	1 (12.5%)	9 (22%)	
Polycystic kidney disease	7 (14.3%)	0	7 (17.1%)	
Vascular nephropathy	5 (10.2%)	0	5 (12.2%)	
Glomerular nephropathy	19 (38.8%)	4 (50%)	15 (36.6%)	
Unknown	2 (4.1%)	0	2 (4.9%)	
First transplantation	44 (89.9%)	6 (75%)	38 (92.7%)	0.18
Interval from kidney transplantation (y)	7.1 (2.9–14.4)	7.78 (4.3–12.8)	7.1 (2.9–14.6)	0.86
Immunosuppressive therapy				
Induction immunosuppression				
Anti-thymocyte globulin	25 (52.1%)	7 (87.5%)	18 (45%)	0.11
Anti-CD25	20 (41.7%)	1 (12.5%)	19 (47.5%)	
No induction	3 (6.3%)	0	3 (7.5%)	
Maintenance immunosuppression				
Tacrolimus	26 (53.1%)	4 (50%)	22 (53.6%)	1
Ciclosporin	16 (32.7%)	2 (25%)	14 (34.2%)	1
MMF/MPA	38 (77.6%)	3 (37.5%)	35 (85.4%)	0.01
mTOR inhibitors	11 (22.5%)	5 (62.5%)	6 (14.6%)	0.01
Azathioprine	1 (2%)	0	1 (2.4%)	1
Steroids	28 (57.1%)	4 (50%)	24 (58.5%)	0.71
Belatacept	2 (4.1%)	0	2 (4.9%)	1
Eculizumab	2 (4.1%)	1 (12.5%)	1 (2.4%)	0.3
Clinical signs at diagnosis				
Dyspnea	19 (38.8%)	1 (12.5%)	18 (43.9%)	0.13
Cough	28 (57.1%)	4 (50%)	24 (58.5%)	0.71
Fever	42 (85.7%)	4 (50%)	38 (92.7%)	0.01
Myalgia	25 (52.1%)	4 (50%)	21 (52.5%)	1
Headache	9 (18.8%)	1 (12.5%)	8 (19.5%)	1
Diarrhea	27 (55.1%)	4 (50%)	23 (56.1%)	1
Vomiting	7 (15.2%)	0	7 (17.1%)	1
Anosmia/ageusia	11 (24.4%)	5 (50%)	7 (17.1%)	0.09
Neurological manifestations	2 (4.1%)	0	2 (4.9%)	1
Clinical signs during follow-up				
Dyspnea	30 (61.2%)	1 (12.5%)	29 (70.7%)	0.003
Cough	36 (73.5%)	5 (62.5%)	31 (75.6%)	0.42
Fever	43 (87.8%)	4 (50%)	39 (95.1%)	0.004
Myalgia	26 (53.1%)	4 (50%)	22 (53.7%)	1
Headache	13 (26.5%)	1 (12.5%)	12 (29.3%)	0.66
Diarrhea	36 (73.5%)	5 (62.5%)	31 (75.6%)	0.42
Vomiting	7 (14.3%)	0	7 (17.1%)	0.58
Anosmia/ageusia	12 (24.5%)	4 (50%)	8 (19.5%)	0.09
Neurological manifestations	17 (34.7%)	1 (12.5%)	16 (39%)	0.14

Continuous variables are presented as medians (interquartile ranges), whereas categorical variables are given as counts (percentages).

ACE, angiotensin converting enzyme; ARB, angiotensin receptor blocker; BMI, body mass index; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; mTOR, mammalian target of rapamycin; RAAS, renin-angiotensin-aldosterone system.

**TABLE 2.**  
**Demographics and clinical characteristics of hospitalized patients according to disease severity**

	Hospitalized patients (n = 41)	Nonsevere patients (n = 21)	Severe patients (n = 20)	P
Men	32 (78%)	19 (90.5%)	13 (65%)	0.06
Age (y)	63.9 (55.2–69.0)	58.4 (50.9–64.3)	65.6 (63.2–70.6)	0.01
>60 y	26 (63.4%)	9 (42.9%)	17 (85%)	0.01
Comorbidities				
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30 (24–33)	25 (23–32)	31 (27.5–33)	0.07
<25 kg/m <sup>2</sup>	13 (31.7%)	11 (52.4%)	2 (10%)	0.02
25–30 kg/m <sup>2</sup>	8 (19.5%)	4 (19.1%)	4 (20%)	
>30 kg/m <sup>2</sup>	21 (51.2%)	7 (33.3%)	14 (70%)	
Cardiovascular disease	17 (41.5%)	8 (38.1%)	9 (45%)	0.76
Respiratory disease	9 (22.0%)	5 (23.8%)	4 (20%)	1
Obstructive sleep apnea	7 (17.1%)	4 (19.1%)	3 (15%)	1
Diabetes	19 (46.4%)	8 (38.1%)	11 (55%)	0.35
Active cancer	0	0	0	
Hypertension	34 (82.9%)	15 (71.4%)	19 (95%)	0.09
RAAS inhibitor use	15 (36.5%)	7 (33.3%)	8 (40%)	0.75
ACE inhibitor use	9 (21.9%)	3 (14.3%)	6 (30%)	0.28
ARB use	6 (14.6%)	4 (19.1%)	2 (10%)	0.66
Interval from kidney transplantation (y)	7.1 (2.9–14.6)	3.8 (2.1–12.6)	8.3 (5.6–14.7)	0.18
Immunosuppressive therapy				
Induction immunosuppression				
Anti-thymocyte globulin	18 (43.9%)	10 (47.6%)	8 (42.1%)	0.9
Anti-CD25	19 (46.3%)	9 (42.9%)	10 (52.6%)	
No induction	3 (7.3%)	2 (9.5%)	1 (5%)	
Maintenance immunosuppression				
Tacrolimus	22 (53.6%)	10 (47.6%)	12 (60%)	0.54
Ciclosporin	14 (34.2%)	7 (33.3%)	7 (35%)	1
MMF/MPA	35 (85.4%)	19 (90.5%)	16 (80%)	0.41
mTOR inhibitors	6 (14.6%)	4 (19.1%)	2 (10%)	0.66
Azathioprine	1 (2.4%)	0	1 (5%)	0.49
Steroids	24 (58.5%)	12 (57.1%)	12 (60%)	1
Belatacept	2 (4.9%)	2 (9.5%)	0	0.49
Eculizumab	1 (2.4%)	0	1 (5%)	0.49
Clinical symptoms during hospitalization				
Dyspnea	29 (70.7%)	9 (42.9%)	20 (100%)	<0.0001
Cough	31 (75.6%)	15 (71.4%)	16 (80%)	0.72
Fever	39 (95.1%)	20 (95.2%)	19 (95%)	1
Myalgia	22 (53.7%)	14 (66.7%)	8 (40%)	0.12
Headache	12 (29.3%)	9 (42.8%)	3 (15%)	0.09
Diarrhea	31 (75.6%)	19 (90.5%)	12 (60%)	0.03
Vomiting	7 (17.1%)	5 (23.8%)	2 (10%)	0.41
Anosmia/ageusia	8 (19.5%)	6 (28.6%)	2 (10%)	0.24
Neurological manifestations	16 (39%)	8 (38.1%)	8 (40%)	1
O <sub>2</sub> need				
O <sub>2</sub> need at admission (L/min)	0 (0–3)	0 (0–0)	2.5 (1.5–4)	<0.0001
Maximum O <sub>2</sub> need (L/min)	5 (0–15)	0 (0–2)	15 (9.75–15)	<0.0001
O <sub>2</sub> need (%)	30 (73.2%)	10 (47.6%)	20 (100%)	0.0002

Continuous variables are presented as medians (interquartile ranges), whereas categorical variables are given as counts (percentages).

ACE, angiotensin converting enzyme; ARB, angiotensin receptor blockers; BMI, body mass index; RAAS, renin–angiotensin–aldosterone system; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid, mTOR: mammalian target of rapamycin.

aged >60 years (124 mg/L versus 55 mg/L, respectively,  $P = 0.019$ ) and with overweight (101 mg/L versus 55 mg/L, respectively,  $P = 0.049$ ). Similarly, peak levels of IL-6 were significantly higher in KTR overweight (68 ng/L versus 27.5 ng/L, respectively,  $P = 0.02$ ). Interestingly, peak values of inflammatory biomarkers showed strong associations with oxygen requirements—with maximum oxygen

need being correlated with both peak IL-6 ( $\rho = 0.740$ ,  $P < 0.0001$ ) and CRP ( $\rho = 0.687$ ,  $P < 0.0001$ ). IL-6 concentrations were also associated with hs-troponin I, LDH, fibrinogen, and D-dimer levels (Table 6).

Peak inflammatory markers were also related to disease severity and clinical outcomes during hospitalization (Table 3). ROC curve analysis revealed that peak



**TABLE 3.****Biochemical markers on admission and peak values in hospitalized patients according to disease severity**

	n	Hospitalized patients (n = 41)	Nonsevere patients (n = 21)	Severe patients (n = 20)	P
Biochemical markers on admission					
Interval from symptom onset (d)		4 (2–7)	3 (2–7)	7 (3.8–7.3)	0.10
C-reactive protein (mg/L)	39	56 (24.5–94.7)	29.5 (41.8–61.5)	67 (54–187)	0.0018
IL-6 (ng/L)	28	24.3 (16.5–53.3)	18.9 (12.6–45.4)	36.6 (21.9–70.2)	0.04
Procalcitonin (µg/L)	28	0.17 (0.14–0.28)	0.16 (0.13–0.21)	0.21 (0.15–0.41)	0.26
Ferritin (µg/L)	17	394.5 (165.3–924.8)	540.5 (300.3–912)	178.5 (164.8–1029.8)	0.80
Albuminemia (g/L)	35	41 (38–42)	41 (40–44)	39.5 (37–41)	0.03
High-sensitivity troponin I (ng/L)	32	20.5 (8.4–38.3)	6.6 (5.1–12)	40.5 (14.6–86.3)	0.01
Lactate dehydrogenase (U/L)	32	264.5 (199–340)	231 (179–340)	287 (242–330)	0.23
Creatine phosphokinase (U/L)	33	101 (60–286)	88 (58.5–267.5)	143 (75–297.5)	0.60
Creatininemia (µmol/L)	41	166 (130–231)	159 (130–200)	179 (138–251)	0.45
Platelet count (/mm <sup>3</sup> )	41	181 000 (156 000–227 000)	188 000 (148 000–214 000)	177 500 (156 000–231 250)	0.66
Neutrophil count (/mm <sup>3</sup> )	36	4010 (3077.5–5167.5)	3590 (2690–4520)	5140 (3840–5970)	0.02
Lymphocyte count (/mm <sup>3</sup> )	38	635 (397.5–930)	660 (420–940)	630 (350–870)	0.88
CD4 (/mm <sup>3</sup> )	24	256 (138.3–385.8)	256 (193.5–303)	221.5 (112.8–483.8)	0.84
CD8 (/mm <sup>3</sup> )	24	138 (84.3–196.8)	153 (86.8–195)	138 (84.5–186)	0.71
IgG (g/L)	28	8.5 (6.9–8.4)	8.3 (7–9.1)	8.7 (6.6–10.1)	0.80
D-dimer (µg/L)	30	1020 (587.5–1460)	990 (615–1440)	1380 (735–1545)	0.56
Fibrinogen (g/L)	29	6 (5–6.8)	5.7 (5–6.46)	6.6 (5.4–7.2)	0.16
PaO <sub>2</sub> (mm Hg)	34	81.5 (73.12–96)	87.7 (81–101)	73.5 (62–82)	0.0088
Viral load in nasopharyngeal swabs (log <sub>10</sub> copies/reaction)	38	5.2 (3.8–6.7)	5.2 (3.7–6)	6.2 (4.6–7)	0.32
Biochemical markers at peak values					
C-reactive protein (mg/L)	39	94 (48–207)	55 (30.4–90.2)	174 (99.3–299)	<0.0001
IL-6 (ng/L)	34	51.7 (25.8–121.4)	27.5 (18.2–52.8)	131.7 (66.7–469.3)	<0.0001
Procalcitonin (µg/L)	32	0.31 (0.18–0.82)	0.22 (0.17–0.42)	0.48 (0.18–4.00)	0.23
Ferritin (µg/L)	27	1128 (546–1630)	1128 (675–1602)	1027 (512–2621)	0.98
Albuminemia (g/L)	32	34 (31.3–38)	35 (32.5–38.5)	32 (24–36)	0.044
High-sensitivity troponin I (ng/L)	34	29.1 (8.8–44.3)	13 (6.6–29.5)	57.15 (34.2–92.7)	0.0003
Lactate dehydrogenase (U/L)	36	356.5 (267.3–504.3)	295 (226.5–420.5)	450 (337–549)	0.013
Creatine phosphokinase (U/L)	34	153 (70.8–338.5)	97 (55.5–282.8)	185 (80.8–497)	0.16
Neutrophil count (/mm <sup>3</sup> )	36	6215 (3593–9565)	4800 (2845–7340)	9400 (5970–10850)	0.003
D-dimer (µg/L)	34	1410 (837.5–2463)	960 (565–1755)	1830 (1315–3430)	0.019
Fibrinogen (g/L)	34	6.7 (5.6–8.3)	6.15 (4.9–7.5)	7.82 (6.5–9)	0.016

Continuous variables are presented as medians (interquartile ranges), whereas categorical variables are given as counts (percentages).

IL, interleukin; Ig, immunoglobulin.

Reference levels for biochemical markers: IL-6 <4 ng/L; procalcitonin <0.05 µg/L; ferritin 22–322 µg/L; high-sensitivity troponin I <79 ng/L; lactate dehydrogenase 120–246 U/L; creatine phosphokinase: 46–171 U/L; D-dimer <500 µg/L; fibrinogen: 2–4 g/L.

IL-6 was strongly associated with both severe COVID-19 (AUC = 0.921,  $P < 0.0001$ ; Figure 2A) and mortality (AUC = 0.821,  $P = 0.015$ ). Peak IL-6—which occurred between day 7 and day 19 after admission—was markedly higher in patients with severe disease (Figure 2B). Further, there were clear associations between IL-6 (cutoff: 65 ng/L), CRP (cutoff: 100 mg/L), and severe COVID-19 and mortality (Figure 2C–F). Markers of cell lysis showed similar associations with outcomes. Specifically, ROC curve analysis revealed that hs-troponin I levels were associated with mortality (AUC = 0.920,  $P = 0.0002$ ). Moreover, there were associations between hs-troponin I (cutoff: 30 ng/L) and LDH (cutoff: 300 U/L) with severe COVID-19 and mortality (Figure 3A–D). With regard to coagulation parameters, we found associations between fibrinogen (cutoff: 6 g/L) and D-dimer (cutoff: 960 ng/mL) with severe COVID-19 and mortality (Figure 4A–D). Notably, none of the patients with hs-troponin I <30 ng/L

( $n = 18$ ), LDH <300 U/L ( $n = 13$ ), D-dimer <960 ng/mL ( $n = 11$ ), and fibrinogen <6 g/L ( $n = 11$ ) died of COVID-19. As expected, severe patients had more extensive lung involvement on chest CT than nonsevere patients (61.5% versus 27.8%, respectively,  $P = 0.07$ ; Figure S1, SDC, <http://links.lww.com/TP/C20>).

### Clinical Outcomes in Severe Versus Nonsevere Patients

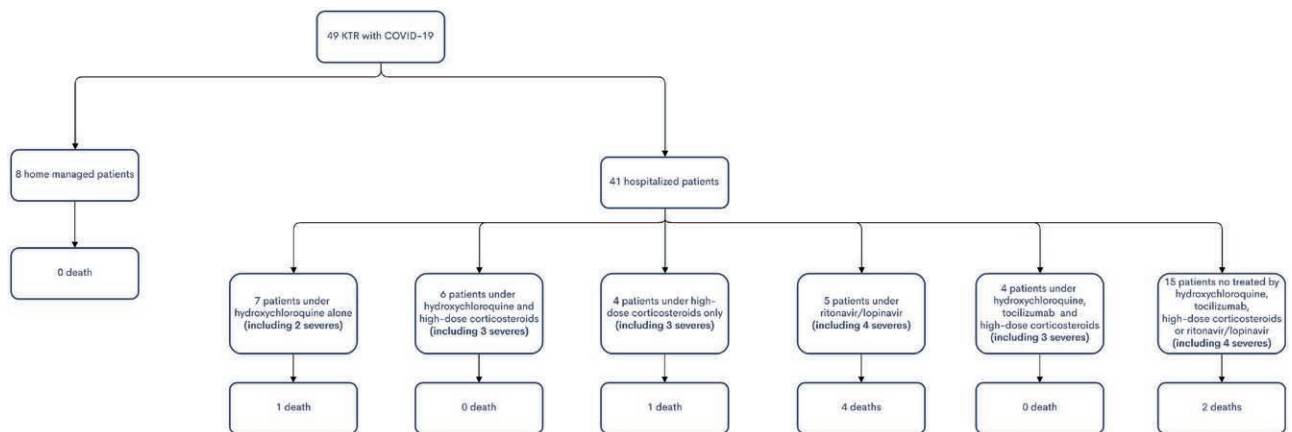
At the time of analysis, the median follow-up time was 42 days (IQR: 35.2–45 d). Patients with severe COVID-19 had a higher risk of acute kidney injury (95% versus 66.7%, respectively,  $P = 0.04$ ) and their mortality rate was as high as 42.9% ( $n = 9$ ). All patients with nonsevere disease were successfully discharged as compared with 8 patients only (40%) in the severe group ( $P < 0.0001$ ; Table 5).

**TABLE 4.**  
**Drugs given to hospitalized patients stratified according to disease severity**

	Hospitalized patients (n = 41)	Nonsevere patients (n = 21)	Severe patients (n = 20)
Azithromycin	26 (65%)	15 (71.4%)	11 (57.9%)
Others antibiotics	41 (100%)	21 (100%)	20 (100%)
Azole	1 (2.5%)	0	1 (5.3%)
Lopinavir–ritonavir	5 (12.2%)	1 (4.76%)	4 (20%)
Hydroxychloroquine	15 (36.6%)	9 (42.9%)	6 (30%)
Tocilizumab	4 (9.8%)	1 (4.8%)	3 (15%)
High-dose corticosteroids <sup>a</sup>	14 (34.2%)	5 (23.8%)	9 (45%)
Immunosuppressive drugs management			
MMF/MPA withdrawal	35/35 (100%)	17 (100%)	18 (100%)
Calcineurin inhibitors withdrawal	15/36 (41.7%)	2 (11.8%)	13 (68.4)
mTOR inhibitors withdrawal	6/6 (100%)	4 (100%)	2 (100%)
Delayed belatacept administration	1/2 (50%)	1	0

<sup>a</sup>High-dose corticosteroids included intravenous dexamethasone and intravenous methylprednisolone. Continuous variables are presented as medians (interquartile ranges), whereas categorical variables are given as counts (percentages).

MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; mTOR, mammalian target of rapamycin.



**FIGURE 1.** Flow of the 49 patients through the study according to treatments and outcomes.

## DISCUSSION

There is an urgent need to shed further light on the clinical course and improve the prognostic stratification of COVID-19 in specific frail populations—including transplant recipients. We conducted the current study to address these issues and investigate whether biomarkers of CRS may predict outcomes.

Here, we show that KTR with COVID-19 was frequently aged >60 years and had a high burden of comorbidities. The clinical presentation was similar to that reported in the general population—with fever and cough being the 2 most common clinical signs.<sup>18–20</sup> However, diarrhea in our sample was as frequent as cough (73.5%) and its prevalence was markedly higher than that described for the general population (3.8%–24%).<sup>18–20</sup> Notably, other published series of KTR have reported a high prevalence of gastrointestinal symptoms (17%–55%).<sup>21–24</sup> It is thus possible that the gastrointestinal manifestations of COVID-19 can occur more frequently in KTR—in whom they may cause acute renal injury and severe electrolyte disturbances. SARS-CoV-2 proactively infects human gut enterocytes<sup>25</sup> and can be detected in stools from patients with diarrhea in 73.3%–85.7% of cases.<sup>26,27</sup> In our study,

only 2 patients underwent search of SARS-CoV-2 in fecal samples and 1 of them tested positive.

A remarkable finding of our study is that patients who were taking MMF/MPA as immunosuppressive drugs were more likely to be hospitalized than those on mTOR inhibitors. Whether this observation could be related to different activities of these drugs on SARS-CoV-2 replication remains unclear. Although an *in vitro* investigation has shown that MPA inhibits MERS-CoV replication, studies on marmosets have linked MMF use with severe and even fatal disease.<sup>28,29</sup> Preliminary data indicate that mTOR inhibitor may potentially be useful to tackle SARS-CoV-2 infection.<sup>30</sup>

Overweight, age >60 years, and dyspnea at onset were associated with severe COVID-19 in our KTR, a finding in line with the general population.<sup>19,31,32</sup> Nonetheless, KTR pose special challenges with regard to immunosuppression management. Because guidelines recommend reducing immunosuppressive therapy,<sup>33</sup> MMF/MPA and mTOR inhibitors were withdrawn in all patients. Further, CNI were preferentially discontinued in severe patients. These results are largely in accordance with those of previous studies focusing on COVID-19 in KTR—in which

**TABLE 5.****Clinical outcomes of hospitalized patients according to disease severity**

	Hospitalized patients (n = 41)	Nonsevere patients (n = 21)	Severe patients (n = 20)	P
ICU admission	14 (34.2%)	0	14 (70%) <sup>a</sup>	<0.0001
Delay from symptom onset to ICU (d)	9.5 (7.5–11.8)	N/A	9.5 (7.5–11.8)	N/A
Renal outcome				
AKI	31 (75.6%)	14 (66.7%)	19 (95%)	0.045
Dialysis	4/31 (12.9%)	1 (4.8%)	3 (15%)	0.61
Complete kidney recovery	19/23 <sup>b</sup> (82.6%)	12 (85.7%)	7 (77.8%)	1
Patients outcome				<0.0001
Discharge	31 (75.6%)	21 (100%)	10 (50%)	
Currently hospitalized	1 (2.4%)	0	1 (5%)	
Death	9 (22%)	0	9 (45%)	
Duration of hospitalization (d)	12 (7–18.5)	8 (5–13)	22.5 (18.3–28.8)	0.0001
Interval from onset symptoms to death (d)	10 (8–16)	N/A	10 (8–16)	N/A

<sup>a</sup>ICU admission was denied for 3 patients.

<sup>b</sup>Only survivor's patients were taken to account.

Continuous variables are presented as medians (interquartile ranges), whereas categorical variables are given as counts (percentages).

AKI, acute kidney injury; ICU, intensive care unit; N/A, not available.

antimetabolites and CNI were withdrawn in 68%–100% and 15%–22.9% of patients, respectively.<sup>21–23,34,35</sup> In the present study, lopinavir-ritonavir was given to 4 patients only because of known pharmacokinetics interaction with CNI and mTOR inhibitors.<sup>34,36</sup> The use of hydroxychloroquine was less frequent in our cohort (36.6%) than in published reports (60%–95%)<sup>21,34,35,37,38</sup> because of frequent treatment-related adverse effects in KTR and inconclusive evidence on its efficacy from the current literature.

An interesting observation from our study is that the inflammatory biomarkers IL-6 and CRP predict severe COVID-19 and COVID-19-related mortality in KTR, a finding in line with those previously obtained in the general and KTR population.<sup>18–21,39</sup> These results point to a key role for proinflammatory mediators in the pathogenesis of severe COVID-19—which is currently conceptualized as a condition in which a dysregulated hyperinflammatory reaction of the host's immune system to SARS-CoV-2 infection occurs.<sup>7,9,40</sup> Here, we identified for the first time the optimal cutoff for IL-6 in the prediction of severe disease and mortality (65 ng/L)—a value in line with that previously reported to be associated with respiratory failure (80 ng/L).<sup>41</sup> Interestingly, we also demonstrate that IL-6

was higher in overweight patients—who are prone to develop severe COVID-19 manifestations. Adipose tissue is an immune organ capable of secreting IL-6,<sup>42,43</sup> especially under hypoxic conditions.<sup>44</sup> This observation offers a potential explanation for the severe disease course of COVID-19 in overweight/obesity.

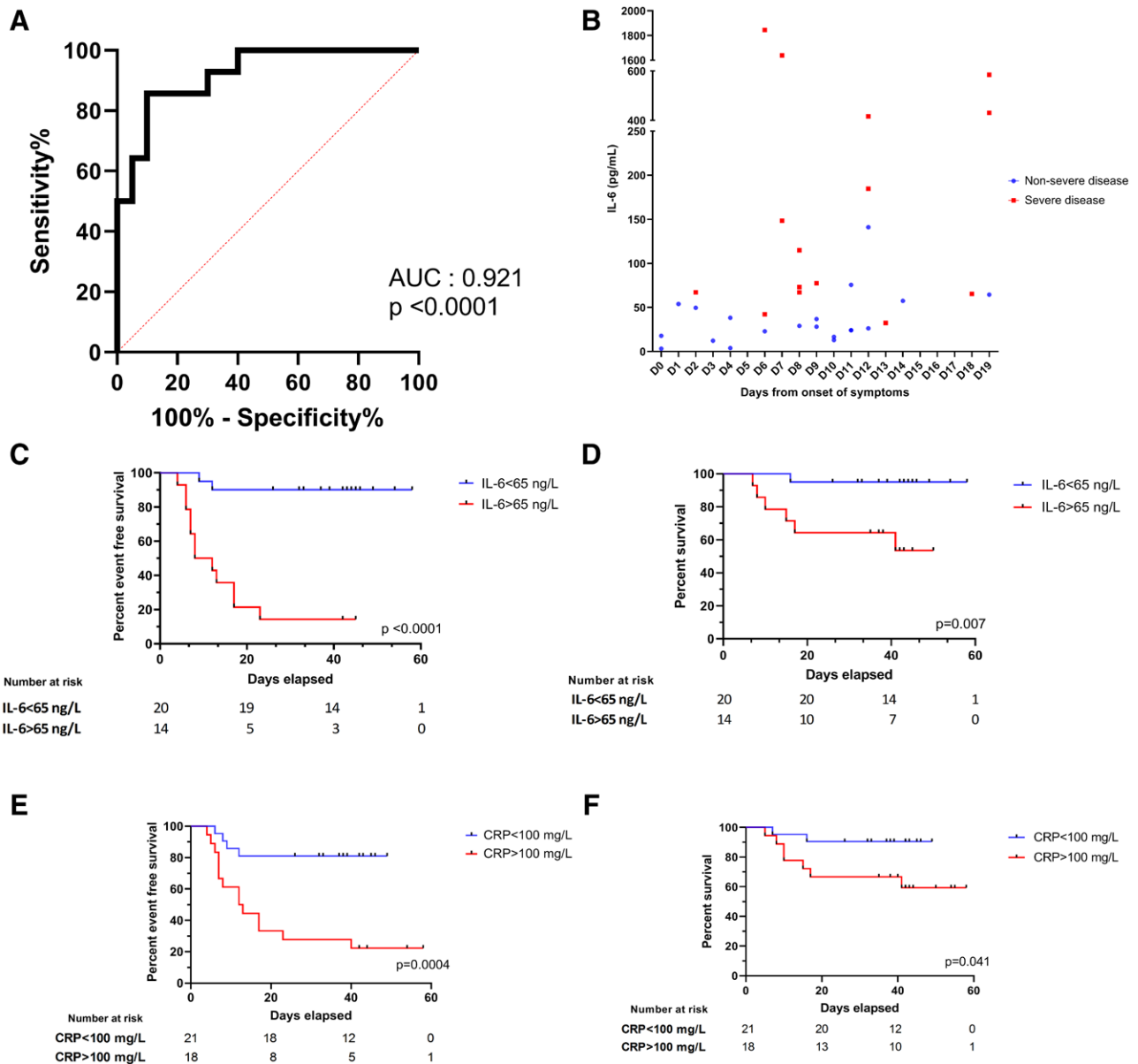
Here, we provide pilot evidence that hs-troponin I—a biomarker specific for myocardial injury—may serve as an early marker of disease severity and mortality. This is in line with the presence of cardiac involvement in ~20% of hospitalized patients with COVID-19.<sup>45</sup> The association between IL-6 and hs-troponin I may also suggest a role for CRS in the pathogenesis of cardiac injury induced by SARS-CoV-2. Autopsy studies of patients with SARS caused by SARS-CoV found evidence of myocarditis and cardiomyocyte hypertrophy even though there was no direct evidence of viral RNA in the myocytes. These findings suggested that cardiac damage was not a direct consequence of cardiomyocyte infection.<sup>46</sup> Further, IL-6 signaling reduces basal cardiac contractility and is capable of inducing hypertrophy.<sup>47</sup> Serum levels of IL-6 and IL-6 gene polymorphisms have also been associated with myocarditis,<sup>48</sup> endothelial dysfunction,<sup>49</sup> and cardiovascular disease.<sup>50–55</sup>

**TABLE 6.****Spearman's correlation coefficients ( $\rho$ ) between hypoxia-related parameters and laboratory variables (biomarkers of inflammation and cell lysis and coagulation parameters)**

	CRP	IL-6	LDH	Hs-troponin I	Fibrinogen	D-dimer	Maximum O <sub>2</sub> need	PO <sub>2</sub> at admission
CRP	–	0.743***	0.645***	0.583***	0.801***	0.344*	0.687***	–0.712***
IL-6	0.743***	–	0.502**	0.370*	0.654***	0.493**	0.740***	–0.547**
LDH	0.645***	0.502**	–	0.292	0.626***	0.368*	0.557**	–0.345
Hs-troponin I	0.583***	0.370*	0.292	–	0.396*	0.362*	0.598***	–0.505**
Fibrinogen	0.801***	0.654***	0.626***	0.396*	–	0.386*	0.646***	–0.611***
D-dimer	0.344*	0.493**	0.368*	0.362*	0.386*	–	0.474**	–0.152
Maximum O <sub>2</sub> need	0.687***	0.740***	0.557**	0.598***	0.646***	0.474**	–	–0.507**
PaO <sub>2</sub> on admission	–0.712***	–0.547**	–0.345	–0.505**	–0.611***	–0.152	–0.507**	–

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

CRP, C-reactive protein; IL, interleukin; LDH, lactate dehydrogenase; hs, high-sensitivity.



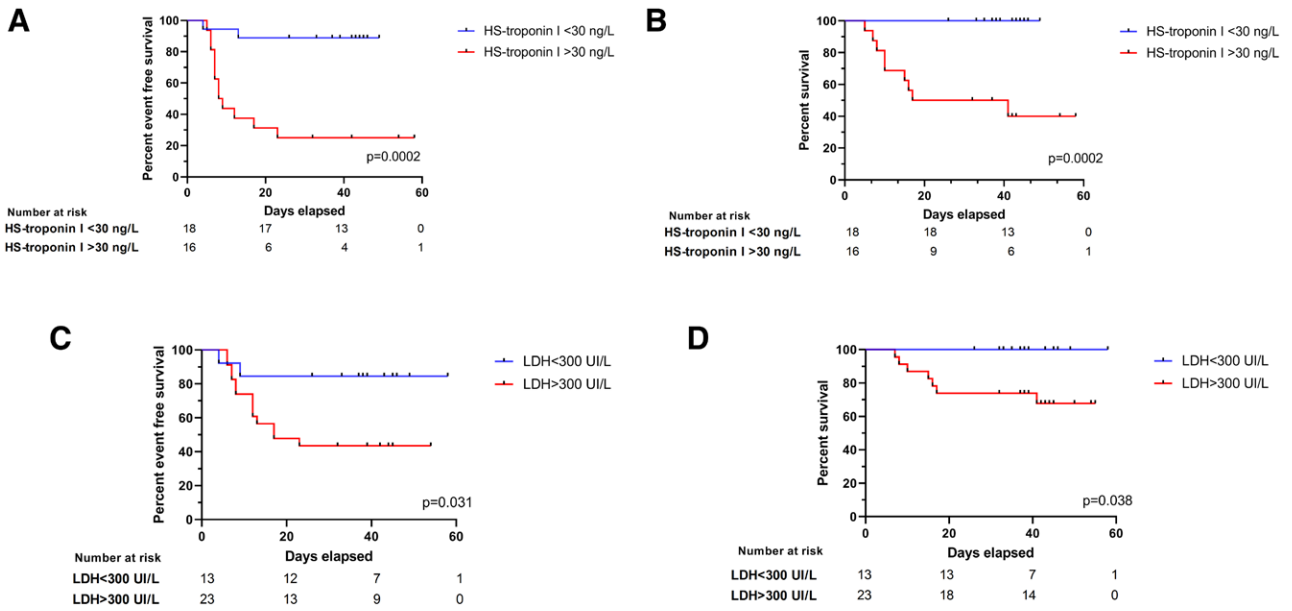
**FIGURE 2.** Circulating levels of inflammatory markers are associated with COVID-19 severity and mortality. A, Receiver operating characteristic curve analysis of COVID-19 severity according to serum interleukin (IL)-6 levels. Area under curve (AUC) = 0.921,  $P < 0.0001$ . B, Scatter plot of IL-6 levels (peak values) against days from symptom onset in patients categorized according to COVID-19 severity. C, Kaplan-Meier plots of severe COVID-19-free survival according to IL-6 levels. IL-6 >65 ng/L (red curve) vs IL-6 <65 ng/L (blue curve),  $P < 0.0001$ . D, Kaplan-Meier plots of COVID-19-free survival according to IL-6 levels. IL-6 >65 ng/L (red curve) vs IL-6 <65 ng/L (blue curve),  $P = 0.07$ . E, Kaplan-Meier plots of severe COVID-19-free survival according to C-reactive protein (CRP) levels. CRP >100 mg/L (red curve) vs CRP <100 mg/L (blue curve),  $P = 0.0004$ . F, Kaplan-Meier plots of COVID-19-free survival according to CRP levels. CRP >100 mg/L (red curve) vs CRP <100 mg/L (blue curve),  $P = 0.041$ .

D-dimer is a known biomarker of severe COVID-19 where it reflects a high thrombotic risk.<sup>56</sup> We found that IL-6 increased early during the course of severe disease whereas D-dimer peaked in later phases. Further, we identified a correlation between IL-6 and D-dimer in COVID-19—an association that reflects a potential link between inflammation and thrombosis. Increased IL-6 levels have been previously associated with hypercoagulation,<sup>57</sup> deep vein thrombosis,<sup>58</sup> and cardiovascular disease.<sup>59</sup> IL-6 is also capable of inducing platelet aggregation and adhesion.<sup>60</sup>

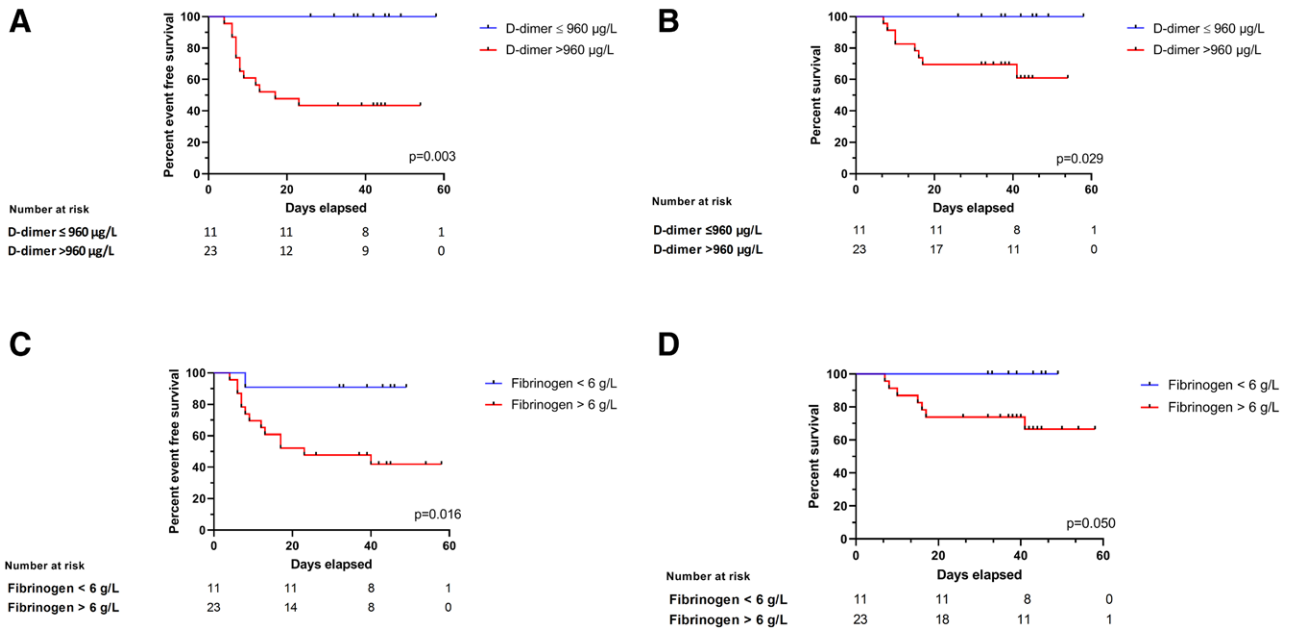
Owing to the paramount role of CRS in the deterioration of respiratory state, 14 (34%) KTR received high-dose steroids upon the identification of increased CRS biomarkers.

The timing of steroids administration is probably paramount to optimize outcomes as data from observational studies have been conflicting. Large randomized controlled trials aimed at clarifying the benefits and risks of corticosteroids in COVID-19 are currently ongoing. IL-6 blockade with tocilizumab is another strategy to effectively tackle CRS and yielded promising results in small series of KTR and in the general population with COVID-19.<sup>35,39</sup> Here, we show that 3 of the 4 patients with CRS who received tocilizumab had favorable outcomes. The patient who did not benefit from the drug received it in a late critical stage when ICU admission was denied. Despite a high mortality rate (32.5%), a recent observational study conducted in 80





**FIGURE 3.** Circulating levels of cell lysis markers are associated with COVID-19 severity and mortality. A, Kaplan-Meier plots of severe COVID-19-free survival according to high-sensitivity (hs)-troponin I levels. Hs-troponin I >30 ng/L (red curve) vs hs-troponin I <30 ng/L (blue curve),  $P = 0.0002$ . B, Kaplan-Meier plots of COVID-19-free survival according to hs-troponin I levels. Hs-troponin I >30 ng/L (red curve) vs hs-troponin I <30 ng/L (blue curve),  $P = 0.0002$ . C, Kaplan-Meier plots severe COVID-19-free survival according to lactate dehydrogenase (LDH) levels. LDH>300 UI/L (red curve) vs LDH <300 UI/L (blue curve),  $P = 0.031$ . D, Kaplan-Meier plots of COVID-19-free survival according to LDH levels. LDH>300 UI/L (red curve) vs LDH <300 UI/L (blue curve),  $P = 0.038$ .



**FIGURE 4.** Circulating levels of coagulation markers are associated with COVID-19 severity and mortality. A, Kaplan-Meier plots of severe COVID-19-free survival according to D-dimer levels. D-dimer >960 µg/L (red curve) vs D-dimer ≤960 µg/L (blue curve),  $P = 0.003$ . B, Kaplan-Meier plots of COVID-19-free survival according to D-dimer levels. D-dimer >960 µg/L (red curve) vs D-dimer ≤960 µg/L (blue curve),  $P = 0.029$ . C, Kaplan-Meier plots of severe COVID-19-free survival according to fibrinogen levels. Fibrinogen >6 g/L (red curve) vs fibrinogen <6 g/L (blue curve),  $P = 0.016$ . D, Kaplan-Meier plots of COVID-19-free survival according to fibrinogen levels. Fibrinogen >6 g/L (red curve) vs fibrinogen <6 g/L (blue curve),  $P = 0.05$ .

KTR patients treated with tocilizumab concluded that this drug is potentially useful to attenuate the adverse consequences of CRS in patients with severe COVID-19.<sup>61</sup>

Our data do not support a prognostic impact of viral load measured on admission in nasopharyngeal swabs. There are conflicting data on this topic in the literature with most<sup>40,62,63</sup> but not all<sup>64</sup> studies indicating a lack of association between viral load and disease severity and/or

prognosis of COVID-19. Our findings from a well-characterized cohort of KTR suggest that CRS biomarkers may be superior to viral load for predicting outcomes.

The mortality rate of COVID-19 in our KTR was 16% after a median follow-up of 34 days (30-d mortality in hospitalized patients: 19.5%). Previous studies conducted in KTR reported mortality rates between 6.66% and 33%.<sup>22,24,65,66</sup> Such unfavorable mortality figures are

likely reflective of the significant comorbidity burden typical of this frail patient population.

To our knowledge, this study is one of the largest to describe the clinical course of COVID-19 in KTR, with a special focus on the prognostic significance of CRS biomarkers. Our data indicate that biomarkers of inflammation, cardiac injury, and coagulopathy all have prognostic significance in this clinical entity. Taken together, our findings suggest that anti-inflammatory strategies (eg, high-dose steroids and IL-6 blockade) and anticoagulant therapy may serve as potential therapeutic tools to reduce disease severity and mortality in KTR with COVID-19.

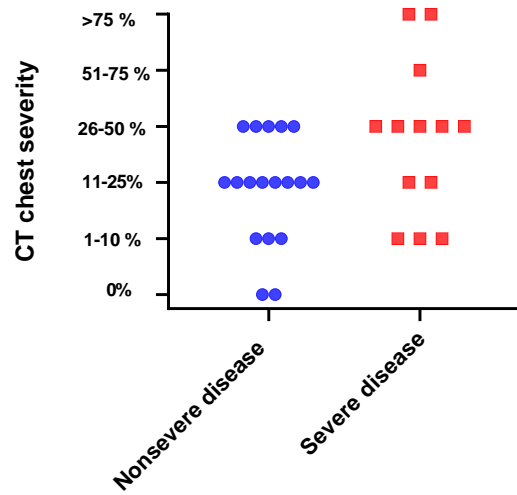
## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the nephrologists of Colmar Hospital, Haguenau Hospital, and Mulhouse Hospital.

## REFERENCES

- Zhu N, Zhang D, Wang W, et al; China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020;382:727–733.
- Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579:270–273.
- Mahase E. Coronavirus: covid-19 has killed more people than SARS and MERS combined, despite lower case fatality rate. *BMJ.* 2020;368:m641.
- Peeri NC, Shrestha N, Rahman MS, et al. The SARS, MERS and novel coronavirus (COVID-19) epidemics, the newest and biggest global health threats: what lessons have we learned? *Int J Epidemiol.* 2020;49:717–726.
- Zheng Z, Peng F, Xu B, et al. Risk factors of critical & mortal COVID-19 cases: a systematic literature review and meta-analysis. *J Infect.* 2020;81:e16–e25.
- Ahn C, Amer H, Anglicheau D, et al. Global Transplantation COVID Report March 2020. *Transplantation.* Published online April 28, 2020..
- Mehta P, McAuley DF, Brown M, et al; HLH Across Speciality Collaboration, UK. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet.* 2020;395:1033–1034.
- Moore JB, June CH. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science.* 2020;368:473–474.
- Chen G, Wu D, Guo W, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest.* 2020;130:2620–2629.
- Ruan Q, Yang K, Wang W, et al. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med.* 2020;46:846–848.
- Anesi GL. Coronavirus-disease-2019-COVID-19-critical-care-and-airway-management-issues. 2020. Available at <https://www.uptodate.com/contents/coronavirus-disease-2019-covid-19-critical-care-and-airway-management-issues>. Accessed August 25, 2020.
- Rilinger J, Kern WV, Duerschmied D, et al. A prospective, randomised, double blind placebo-controlled trial to evaluate the efficacy and safety of tocilizumab in patients with severe COVID-19 pneumonia (TOC-COVID): a structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial. *Trials.* 2020;21:470.
- Rabec C, Gonzalez-Bermejo J. Procedure for the pulmonary management of non-ICU patients hospitalized in the context of the COVID-19 pandemic. 2020. Available at <https://splf.fr/wp-content/uploads/2020/04/Respi-PreRe-A-SPLF-GAVO2-avril-2020-englis-versi-on-r.pdf>. Accessed August 25, 2020.
- World Health Organization. Molecular assays to diagnose COVID-19: summary table of available protocols. 2020. Available at <https://www.who.int/proxy.insermbiblio.inist.fr/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>. Accessed June 6, 2020.
- Glady L, Lavaux T, Charchour R, et al. Interleukin-6 chemiluminescent immunoassay on lumipulse G600 II: analytical evaluation and comparison with three other laboratory analyzers. *Clin Chem Lab Med.* 2020;58:e229–e231.
- Ai T, Yang Z, Hou H, et al. Correlation of chest CT and RT-PCR testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: a report of 1014 cases. *Radiology.* 2020;296:E32–E40.
- Revel MP, Parkar AP, Prosch H, et al; European Society of Radiology (ESR) and the European Society of Thoracic Imaging (ESTI). COVID-19 patients and the radiology department—advice from the European Society of Radiology (ESR) and the European Society of Thoracic Imaging (ESTI). *Eur Radiol.* 2020;30:4903–4909.
- Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, et al; China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020;382:1708–1720.
- Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020;395:1054–1062.
- Goyal P, Choi JJ, Pinheiro LC, et al. Clinical characteristics of Covid-19 in New York City. *N Engl J Med.* 2020;382:2372–2374.
- Cravedi P, Mothi SS, Azzi Y, et al; for the TANGO Study Group. COVID-19 and kidney transplantation: results from the TANGO International Transplant Consortium. *Am J Transplant.* 2020;20:3140–3148.
- Bossini N, Alberici F, Delbarba E, et al. Kidney transplant patients with SARS-CoV-2 infection: the Brescia Renal COVID task force experience. *Am J Transplant.* 2020;20:3019–3029.
- Chaudhry ZS, Williams JD, Vahia A, et al. Clinical characteristics and outcomes of COVID-19 in solid organ transplant recipients: a cohort study. *Am J Transplant.* 2020;20:3051–3060.
- Crespo M, Mazuecos A, Rodrigo E, et al. Respiratory and gastrointestinal COVID-19 phenotypes in kidney transplant recipients. *Transplantation.* 2020;104:2225–2233.
- Xiao F, Tang M, Zheng X, et al. Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology.* 2020;158:1831–1833.e3.
- Chen Y, Chen L, Deng Q, et al. The presence of SARS-CoV-2 RNA in the feces of COVID-19 patients. *J Med Virol.* 2020;92:833–840.
- Han C, Duan C, Zhang S, et al. Digestive symptoms in COVID-19 patients with mild disease severity: clinical presentation, stool viral RNA testing, and outcomes. *Am J Gastroenterol.* 2020;115:916–923.
- Cheng KW, Cheng SC, Chen WY, et al. Thiopurine analogs and mycophenolic acid synergistically inhibit the papain-like protease of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Antiviral Res.* 2015;115:9–16.
- Chan JF, Yao Y, Yeung ML, et al. Treatment with lopinavir/ritonavir or interferon-β1b improves outcome of MERS-CoV infection in a nonhuman primate model of common marmoset. *J Infect Dis.* 2015;212:1904–1913.
- Maiese K. The mechanistic target of rapamycin (mTOR): novel considerations as an antiviral treatment and possibilities for COVID-19. *Curr Neurovasc Res.* 2020;17:332–337.
- Shi Y, Yu X, Zhao H, et al. Host susceptibility to severe COVID-19 and establishment of a host risk score: findings of 487 cases outside Wuhan. *Crit Care.* 2020;24:108.
- Henry BM, Lippi G. Chronic kidney disease is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection. *Int Urol Nephrol.* 2020;52:1193–1194.
- DESCARTES expert opinion regarding the management of immunosuppressive medication for kidney transplant patients during the COVID-19 pandemic. Accessed September 25, 2020. Available from <https://www.era-edta.org/en/wp-content/uploads/2020/04/Expert-opinion-on-IsD-in-Covid-19.pdf>.
- Alberici F, Delbarba E, Manenti C, et al. A single center observational study of the clinical characteristics and short-term outcome of 20 kidney transplant patients admitted for SARS-CoV2 pneumonia. *Kidney Int.* 2020;97:1083–1088.
- Akalin E, Azzi Y, Bartash R, et al. Covid-19 and kidney transplantation. *N Engl J Med.* 2020;382:2475–2477.
- Gandolfini I, Delsante M, Fiaccadori E, et al. COVID-19 in kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2020;20:319.
- Columbia University Kidney Transplant Program. Early description of coronavirus 2019 disease in kidney transplant recipients in New York. *J Am Soc Nephrol.* 2020;31:1150–1156.
- Yi SG, Rogers AW, Saharia A, et al. Early experience with COVID-19 and solid organ transplantation at a US high-volume transplant center. *Transplantation.* 2020;104:2208–2214.
- Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395:497–506.
- Hadjadj J, Yattim N, Barnabei L, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science.* 2020;369:718–724.

41. Herold T, Jurinovic V, Arnreich C, et al. Elevated levels of IL-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;146:128–136.e4.
42. Park HS, Park JY, Yu R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005;69:29–35.
43. Vieira-Potter VJ. Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues. *Cell Microbiol*. 2014;16:1484–1492.
44. Kheirandish-Gozal L, Gozal D. Obstructive sleep apnea and inflammation: proof of concept based on two illustrative cytokines. *Int J Mol Sci*. 2019;20:459.
45. Shi S, Qin M, Shen B, et al. Association of cardiac injury with mortality in hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Cardiol*. 2020;5:802–810.
46. Oudit GY, Kassiri Z, Jiang C, et al. SARS-coronavirus modulation of myocardial ACE2 expression and inflammation in patients with SARS. *Eur J Clin Invest*. 2009;39:618–625.
47. Fontes JA, Rose NR, Čiháková D. The varying faces of IL-6: from cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine*. 2015;74:62–68.
48. Sazonova SI, Ilushenkova JN, Batalov RE, et al. Plasma markers of myocardial inflammation at isolated atrial fibrillation. *J Arrhythm*. 2018;34:493–500.
49. Esteve E, Castro A, López-Bermejo A, et al. Serum interleukin-6 correlates with endothelial dysfunction in healthy men independently of insulin sensitivity. *Diabetes Care*. 2007;30:939–945.
50. Simon TG, Trejo MEP, McClelland R, et al. Circulating Interleukin-6 is a biomarker for coronary atherosclerosis in nonalcoholic fatty liver disease: results from the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Int J Cardiol*. 2018;259:198–204.
51. Zhang X, Ma L, Peng F, et al. The endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus is associated with IL-6 gene promoter polymorphism in Chinese population. *Endocrine*. 2011;40:124–129.
52. González-Castro TB, Hernández-Díaz Y, Pérez-Hernández N, et al. Interleukin 6 (rs1800795) gene polymorphism is associated with cardiovascular diseases: a meta-analysis of 74 studies with 86,229 subjects. *Excli J*. 2019;18:331–355.
53. Groot HE, Al Ali L, van der Horst ICC, et al. Plasma interleukin 6 levels are associated with cardiac function after ST-elevation myocardial infarction. *Clin Res Cardiol*. 2019;108:612–621.
54. Bick AG, Pirruccello JP, Griffin GK, et al. Genetic interleukin 6 signaling deficiency attenuates cardiovascular risk in clonal hematopoiesis. *Circulation*. 2020;141:124–131.
55. Interleukin-6 Receptor Mendelian Randomisation Analysis (IL6R MR) Consortium, Swerdlow DI, Holmes MV, et al. The interleukin-6 receptor as a target for prevention of coronary heart disease: a mendelian randomisation analysis. *Lancet Lond Engl*. 2012;379:1214–1224.
56. Helms J, Tacquard C, Severac F, et al. High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intensive Care Med*. 2020;46:1089–1098.
57. Bester J, Matshailwe C, Pretorius E. Simultaneous presence of hypercoagulation and increased clot lysis time due to IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8. *Cytokine*. 2018;110:237–242.
58. Zhang Y, Zhang Z, Wei R, et al. IL (interleukin)-6 contributes to deep vein thrombosis and is negatively regulated by miR-338-5p. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40:323–334.
59. Cronjé HT, Nienaber-Rousseau C, Zandberg L, et al. Fibrinogen and clot-related phenotypes determined by fibrinogen polymorphisms: independent and IL-6-interactive associations. *PLoS One*. 2017;12:e0187712.
60. Bernardo A, Ball C, Nolasco L, et al. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood*. 2004;104:100–106.
61. Pérez-Sáez MJ, Blasco M, Redondo-Pachón D, et al. Use of tocilizumab in kidney transplant recipients with COVID-19. *Am J Transplant*. 2020;20:3182–3190.
62. To KK, Tsang OT, Leung WS, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2020;20:565–574.
63. He X, Lau EHY, Wu P, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med*. 2020;26:672–675.
64. Liu Y, Yan LM, Wan L, et al. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis*. 2020;20:656–657.
65. Feldin M, Softeland JM, Magnusson J, et al. Initial report from a Swedish high-volume transplant center after the first wave of the COVID-19 pandemic. *Transplantation*. [Epub ahead of print. August 20, 2020].
66. Mohamed IH, Chowdary PB, Shetty S, et al. Outcomes of renal transplant recipients with SARS-CoV-2 infection in the eye of the storm: a comparative study with waitlisted patients. *Transplantation*. [Epub ahead of print. July 31, 2020]. doi:10.1097/TP.0000000000003406



**Figure S1.** Scatter plot depicting the relationship between COVID-19 clinical severity and radiological severity on chest CT. When two chest CT scans were performed during hospital stay, the image with the highest radiological severity was considered for the purpose of analysis.

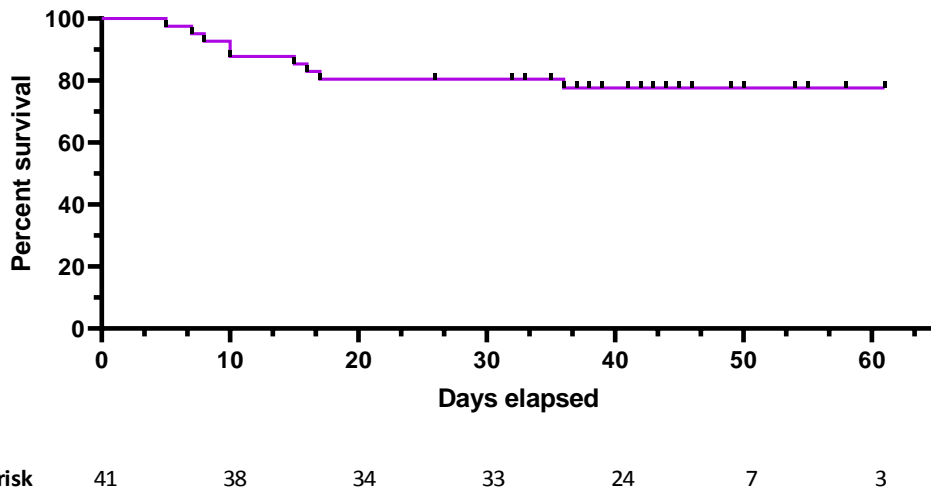




\*Biological data are not available

AZ: azithromycin, CRP: C-reactive protein, CS: high steroids dose (intravenous dexamethasone and intravenous methylprednisolone), HC: hydroxychloroquine, IL-6: interleukin 6, LR: lopinavir-ritonavir

**Figure S2.** Timeline for each hospitalized patient, which includes COVID-19 treatment, the evolution of CRP (figure S2a) and IL-6 (figure S2b) over time, and the clinical outcome. Each line represents a patient, whereas one box denotes one day (days from the onset of symptoms). Gray boxes indicate the days before Covid-19 diagnosis. White boxes denote the days required a hospitalization in a conventional unit. Orange boxes represent the days of hospitalization in an intensive care unit whereas red boxes represent the day of death. Green boxes denote days of follow-up after hospital discharge. Vertical black lines denote the end of follow-up.



**Figure S3.** Kaplan-Meier plot of COVID-19-free survival (30-day mortality rate: 19.5%).



## **IV. Évaluation virologique approfondie et réponse sérologique des transplantés rénaux atteints de COVID-19**

### **A. Caractéristiques de la charge virale SARS-CoV-2**

#### **1) *Rationnel et objectifs de l'étude***

Après avoir observé une association entre les marqueurs du SRC et la sévérité ainsi que la mortalité du COVID-19 chez les transplantés rénaux, nous nous sommes intéressés à la cinétique de la réplication virale chez un hôte immunodéprimé et la réponse immunitaire sérologique vis-à-vis d'une infection naturelle par le SARS-CoV-2. De précédentes données montraient que la réplication de certains virus respiratoires était prolongée chez l'immunodéprimé.<sup>610</sup> Une excrétion virale prolongée a des implications importantes pour la santé publique, en particulier en ce qui concerne l'isolement des patients et l'émergence potentielle de variants. De plus, l'impact d'une charge virale élevée et prolongée sur la sévérité de la maladie n'était pas connu. Nous avons, dans un premier temps, étudié les caractéristiques de la charge virale SARS-CoV-2 (charges virales initiales, pics et cinétique à moyen terme) au niveau nasopharyngé et sanguin dans une cohorte de transplantés rénaux. Nous avons analysé le lien entre ces charges virales et la sévérité ainsi que la mortalité liées au COVID-19. Nous avons également étudié la viabilité du virus retrouvé dans les prélèvements nasopharyngés chez les transplantés rénaux à moyen terme.

#### **2) *Principaux résultats***

##### **(a) Cinétique de la charge virale nasopharyngée**

Un total de 118 échantillons des voies respiratoires supérieures provenant de 40 transplantés rénaux a été analysé (médiane de 3 écouvillons par patient [EI : 2-3 écouvillons]). La charge virale médiane était de 5,17 log<sub>10</sub> copies/réaction (EI : 3,80-6,69) au moment du diagnostic (entre J0 après l'apparition des symptômes et J14). Au total, 29 patients (74,4 %) avaient un pic de charge virale à l'admission. Parmi les patients avec un résultat RT-PCR initial positif (n =

37), aucun patient n'a présenté de clairance virale avant J21. Quinze (38,5 %) patients ont présenté une charge virale positive  $> 3 \log_{10}$  copies/réaction après J10, et 10 patients (24,4 %) ont présenté une excrétion virale persistante après J30 (figure 39).

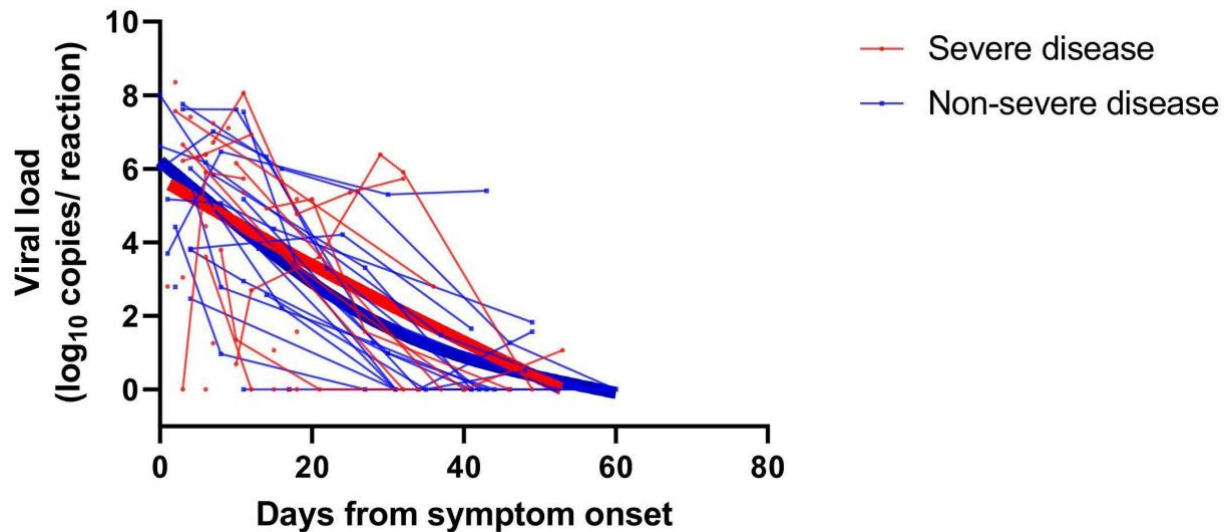


Figure 39. Cinétique de la charge virale du SARS-CoV-2 au niveau nasopharyngé.

Les patients sont stratifiés en fonction de la sévérité de la maladie : non sévère (bleu) et sévère (rouge). Les lignes épaisses montrent la tendance globale de la charge virale.

#### (b) Viabilité du SARS-CoV-2

À l'aide de cultures cellulaires, nous avons examiné la viabilité du virus dans un sous-groupe de 16 transplantés rénaux comprenant 40 échantillons nasopharyngés positifs pour le SARS-CoV-2 en RT-PCR jusqu'à 39 jours après l'apparition des symptômes. Depuis l'apparition des symptômes jusqu'à 38 jours après, nous avons analysé une médiane de deux écouvillons nasopharyngés par patient (EI : 2–3,3). L'excrétion de SARS-CoV-2 viable a été identifiée dans un total de 17 écouvillons (42,5 %) issus de 9 patients (56,2 %). La plupart (56,2 %) des échantillons prélevés dans les 10 jours suivant l'apparition des symptômes présentaient des cultures virales positives. Du virus viable a été détecté dans 8 des 24 (33,3 %) échantillons prélevés au moins 10 jours après l'apparition des symptômes. De plus, une durée d'excrétion du SARS-CoV-2 viable  $> 3$  semaines à compter de l'apparition des symptômes a été identifiée

chez quatre patients (25 % ; figure 40). Bien qu'aucun de ces quatre patients n'ait eu de COVID-19 sévère, des charges virales (exprimées en seuil de cycle ou CT dans cette sous-étude) élevées ont été notées dans leurs prélèvements nasopharyngés à l'admission (24, 21, 16 et 17 CT), contre une médiane de 26 CT, EI : 23–30 Ct chez les 12 patients restants.

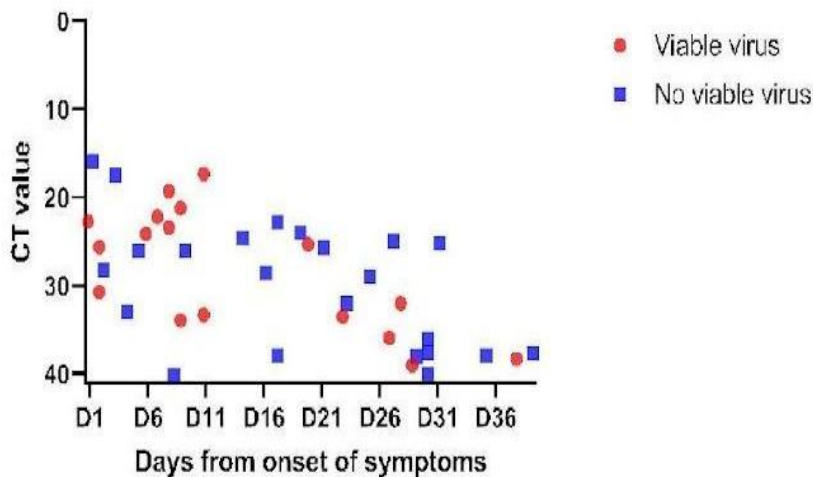
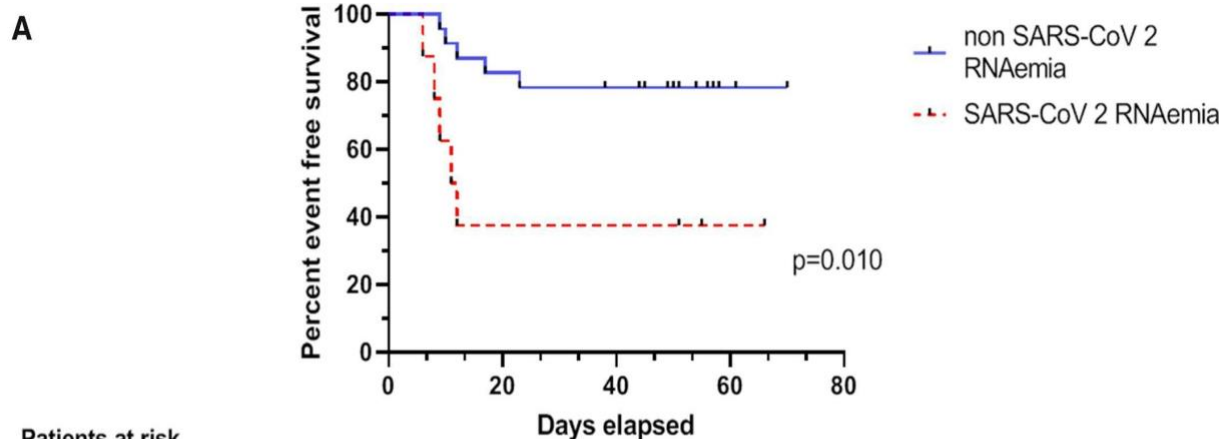


Figure 40. Présence (points rouges) ou absence (points bleus) d'excrétion viable du SARS-CoV-2 (sur la base des résultats de la culture virale) par rapport aux valeurs du seuil de cycle (*cycle threshold*, CT) et aux jours après l'apparition des symptômes.

### (c) Charge virale du SARS-CoV-2 et sévérité du COVID-19

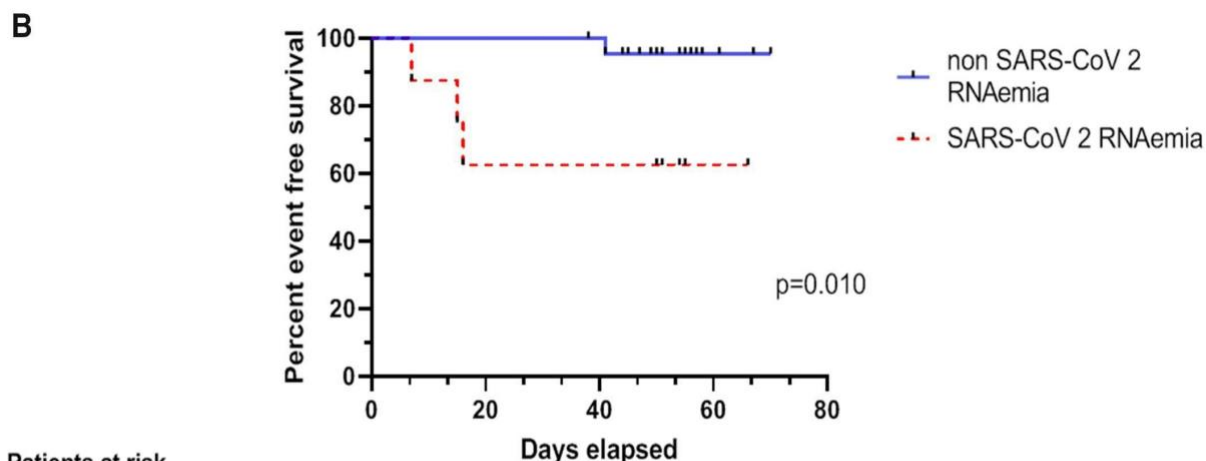
Dans la cohorte des 40 patients transplantés, la charge virale à l'admission n'était pas statistiquement différente entre les patients ayant un COVID-19 sévère et non sévère ( $6,22 \log_{10}$  copies/réaction vs  $5,17 \log_{10}$  copies/réaction, respectivement,  $p = 0,29$ ) et n'était pas prédictive de la gravité de la maladie (aire sous la courbe ROC = 0,595,  $p = 0,31$ ) à l'admission, au pic de la charge ou au cours de la maladie (figure 39). De plus, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la charge virale maximale et les marqueurs inflammatoires : l'IL-6 ( $\rho$  de Spearman = 0,041,  $p = 0,81$ ) et la CRP ( $\rho$  de Spearman = 0,001,  $p = 0,99$ ). Les patients sous corticothérapie et ne présentant pas de symptômes gastro-intestinaux présentaient une charge virale plus élevée.

Les charges virales sanguines SARS-CoV-2 ont été mesurées dans 73 échantillons de plasma provenant de 31 patients (21 dans le groupe non sévère et 10 dans le groupe sévère). Les charges virales plasmatiques positives variaient de 1 à 4,55 log<sub>10</sub> copies/réaction. Trois patients avaient une ARNémie positive à l'admission et 8 ont montré au moins une ARNémie positive au cours de la période de suivi. Les patients sévères ont montré une fréquence plus élevée d'ARNémie par rapport aux patients non sévères (50 % versus 14,3 %, respectivement,  $p = 0,01$ , figure 41). De plus, l'ARNémie s'est avérée associée à la mortalité (figure 41). L'ARNémie était présente chez 3 des 4 patients non-survivants testés ; en revanche, seuls 5 des 29 (24 %) patients survivants testés avaient une ARNémie positive ( $p = 0,035$ ). De plus, deux patients non survivants présentaient les charges virales les plus élevées (4,55 log<sub>10</sub> copies/réaction et 4,26 log<sub>10</sub> copies/réaction), tandis que les autres patients présentaient une ARNémie plus faible ( $< 2,16$  log<sub>10</sub> copies/réaction). Il n'y avait aucune corrélation entre l'ARNémie du SARS-CoV-2 et les charges virales nasopharyngées à l'admission ( $\rho$  de Spearman = 0,375,  $p = 0,13$ ) et pendant le suivi ( $\rho = 0,159$ ,  $p = 0,41$ ).



Patients at risk

non SARS-CoV 2 RNAemia	23	20	18	3
SARS-CoV 2 RNAemia	8	4	4	2



Patients at risk

non SARS-CoV 2 RNAemia	23	23	26	4
SARS-CoV 2 RNAemia	8	6	6	2

Figure 41. Association de l'ARNémie SARS-CoV-2 positive avec la gravité et la mortalité du COVID-19.

A, Courbe de Kaplan-Meier de la survie sans COVID-19 sévère selon l'ARNémie du SARS-CoV-2. Présence d'ARNémie du SARS-CoV-2 (courbe rouge en pointillés) par rapport à son absence (courbe bleue continue),  $p = 0,01$ . B, Courbe de Kaplan-Meier de la survie selon l'ARNémie du SARS-CoV-2. Présence d'ARNémie du SARS-CoV-2 (courbe rouge en pointillés) par rapport à son absence (courbe bleue continue),  $p = 0,01$ .

## B. Séroconversion et cinétique de la charge virale SARS-CoV-2

### 1) *Rationnel et objectifs de l'étude*

Au moment de ce travail, les données sur la cinétique à court et moyen termes de la réponse des anticorps au SARS-CoV-2 après le COVID-19 dans la population immunodéprimée étaient rares. Il était important de savoir si cette population d'immunodéprimés présentait une séroconversion liée à l'infection, si la cinétique des anticorps était similaire ou moins favorable à celle observée chez l'immunocompétent. Un défaut de séroconversion ou un déclin rapide du titre d'anticorps pouvaient exposer à un risque de réinfection. Alors que les données sur une diminution des titres d'anticorps chez les patients immunocompétents étaient controversées.

### 2) *Principaux résultats*

Dans un premier temps, nous avons décrit la réponse sérologique contre le SARS-CoV-2 chez 35 transplantés rénaux hospitalisés pour COVID-19 jusqu'à 2 mois après l'apparition des symptômes. Nous avons étudié les titres d'anticorps IgM et IgG dirigés contre les protéines N et S à l'aide d'un test ELISA (DIA.PRO Diagnostic BioProbes Srl, Sesto San Giovanni, Italie). Les échantillons avec un rapport signal/seuil ( $S / CO \geq 1,1$ ) étaient considérés comme positifs,  $\geq 0,9$  et  $< 1,1$  équivoques et  $< 0,9$  négatifs.

Au total, 116 échantillons provenant de 35 patients ont été analysés, avec une médiane de 3 sérums testés par patient (EI : 2-4 sérums). Tous les survivants étaient séropositifs lors du suivi. Quatre non survivants avaient une sérologie négative au moment de leur décès, survenu à J7, J10, J15 et J16. Parmi les 25 échantillons testés avant J8, 6 (24 %) étaient séropositifs alors que tous les échantillons testés après J14 étaient séropositifs (figure 42). La cinétique des anticorps a montré qu'un titre stable d'anticorps IgG était maintenu jusqu'à J59, suggérant une persistance

de l'immunité au moins jusqu'à 2 mois après l'infection. Les titres d'anticorps IgM et IgG et un retard de séroconversion n'étaient pas corrélés à la gravité du COVID-19.

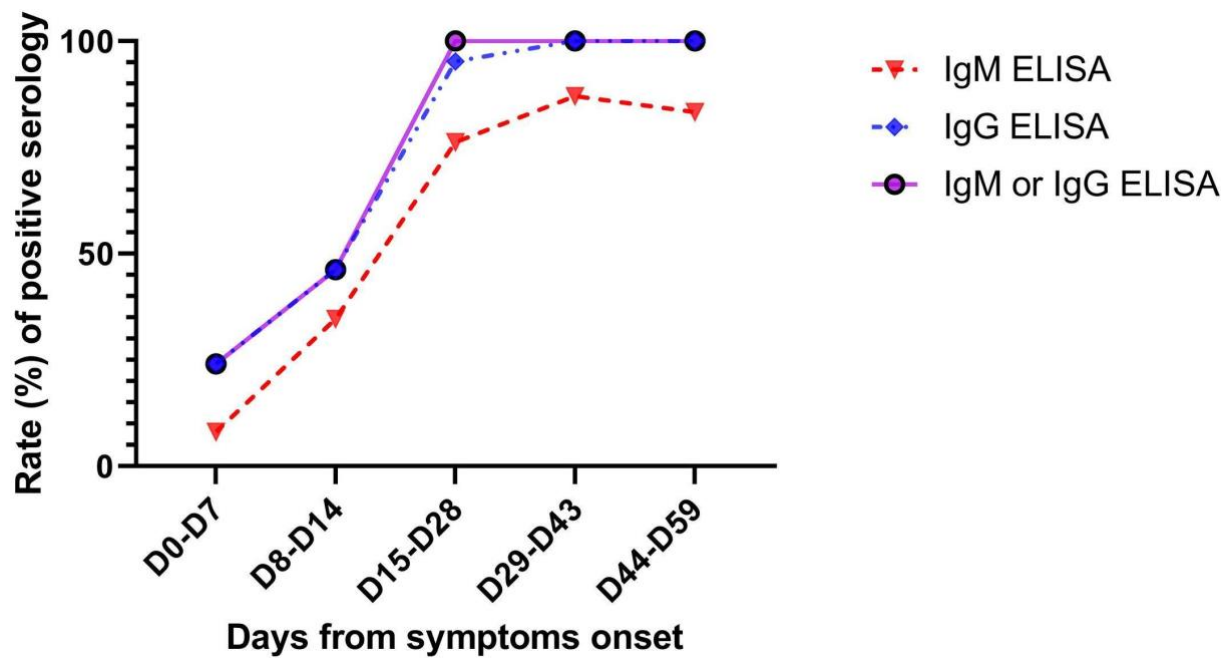


Figure 42. Taux d'anticorps anti-SARS-CoV-2 positif selon le délai d'apparition des symptômes

Taux d'IgM SARS-CoV-2 positifs (courbe rouge en pointillé avec triangles), IgG (courbe bleue en pointillés avec losange) et IgM ou IgG (courbe violette pleine) testés par un ELISA selon les jours depuis l'apparition des symptômes. Au total, 116 échantillons provenant de 35 patients ont été testés. À partir du 15<sup>ème</sup> jour (J15), tous les échantillons étaient positifs en IgM ou IgG.

Ensuite, les titres d'anticorps ont été mesurés prospectivement dans la même cohorte jusqu'à 6 mois après l'apparition des symptômes. Tous les patients survivants ( $n = 29$ ) décrits dans notre précédente étude ont été inclus. Les IgM et IgG étaient détectables après une médiane de J17 et ont atteint un pic à J37 (EI : 23-48) et J38 (EI : 30-50), respectivement (figure 43). Les pics d'IgG étaient positivement corrélés aux pics de la charge virale nasopharyngée ( $\rho$  de Spearman = 0,36,  $p = 0,05$ ) et inversement corrélés à la durée de détection d'ARNm du SARS-CoV-2 dans les prélèvements nasopharyngés ( $\rho$  de Spearman = -0,46,  $p = 0,001$ ). Le pourcentage médian de déclin était de 83 % (EI : 70–91 %) pour les IgM et 68 % (EI : 32 %–83 %) pour les

IgG. Entre J145 et J190, la grande majorité des patients (n = 21, 72,4 %) sont restés séropositifs, deux ont eu des résultats IgG équivoques en l'absence d'IgM, et seulement six (20,7 %) ont présenté une sérologie négative. Les patients traités avec des inhibiteurs de la calcineurine et des stéroïdes ont montré une réduction plus prononcée des IgG, inversement corrélée au pic d'IgG ( $\rho$  de Spearman = -0,46,  $p = 0,001$ ). Le pic et la cinétique des IgG ne différaient pas significativement selon la gravité du COVID-19 (figure 43).

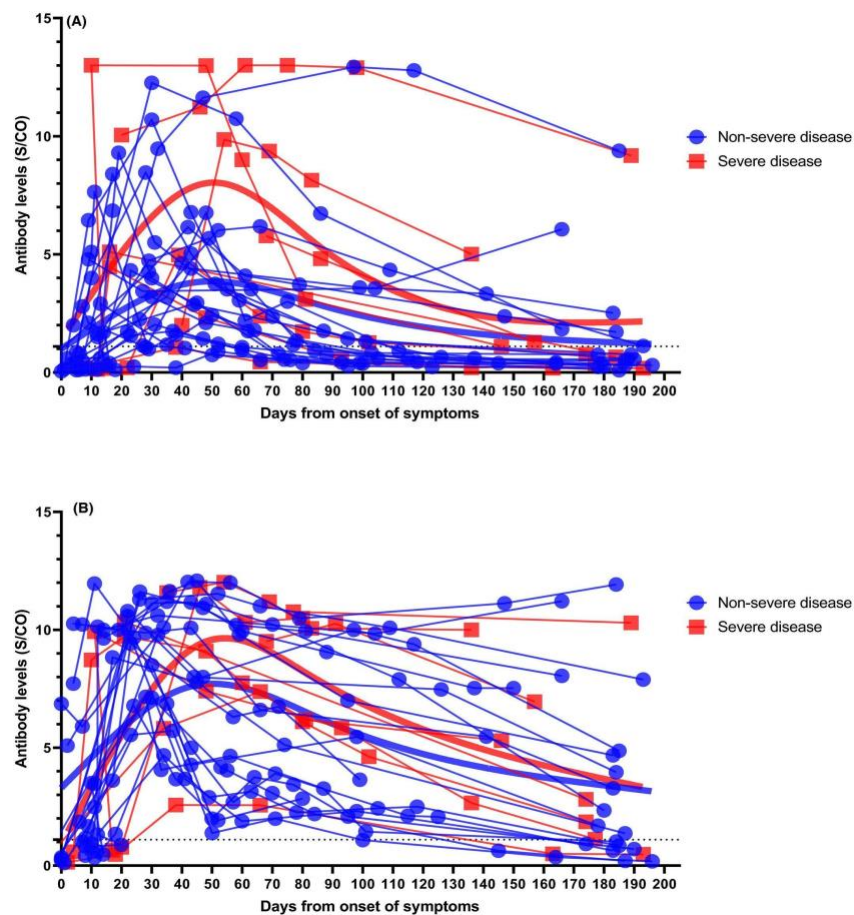


Figure 43. Cinétique des titres IgM et IgG SARS-CoV-2 testée par ELISA.

Cinétique des titres IgM (A) et IgG (B) à partir du jour du début des symptômes (B). La cinétique de chaque patient (n = 29) est présentée en fonction de la sévérité du COVID-19 (maladie non sévère : bleu ; maladie sévère : rouge). Les lignes épaisses indiquent la tendance du titre d'anticorps de l'ensemble de la cohorte. Les taux d'anticorps sont présentés sous forme de rapport signal/seuil mesuré (S/CO). La ligne en pointillées représente la valeur seuil (1,1) de séropositivité.



### 3) *Principaux points de discussion*

À l'aide de cultures cellulaires *in vitro*, nous avons constaté qu'une proportion importante de transplantés rénaux atteints de COVID-19 peut avoir une période d'excrétion prolongée de SARS-CoV-2 viable. L'utilisation des cultures cellulaires pour définir l'infectivité du virus a été critiquée car elle pourrait sur-exprimer la croissance virale et ne pas représenter véritablement la pathogénèse virale et la transmutabilité chez l'hôte humain.<sup>611</sup> Mais des données de la croissance virale dans l'épithélium des voies respiratoires humaines ont finalement révélé une dynamique virale comparable et ont écarté cette hypothèse.<sup>612</sup> Nous avons identifié quatre transplantés rénaux excréant un SARS-CoV-2 viable plus de 3 semaines après l'apparition des symptômes (jusqu'à 38 jours). Bien qu'aucun de ces patients n'ait eu de COVID-19 sévère, ils ont montré des charges virales plus élevées dans leurs prélèvements nasopharyngés. De plus, ils présentaient une inflammation moins intense que les autres patients, peut-être en raison d'une réponse immunitaire réduite au SARS-CoV-2. Une revue systématique de la littérature concernant des données sur l'infectiosité du SARS-CoV-2 montrent que 95 % des échantillons ne sont plus viables après J15 dans la population générale, avec une médiane de 11 jours. En revanche, chez les patients hospitalisés en soins critiques et des individus immunodéprimés, l'excrétion virale viable pourrait durer jusqu'à 2 et 4 mois, respectivement, avec une médiane de 20 jours.<sup>613</sup> Ce qui est en accord avec nos données.

Étonnamment, nous avons identifié une excrétion viable du SARS-CoV-2 dans trois cas caractérisés par de faibles charges virales ( $Ct \geq 35$ ). Alors que la présence de virus viables est généralement inversement corrélée avec le Ct, ce n'est pas toujours le cas. Dans la revue de la littérature citée précédemment<sup>613</sup>, la limite supérieure du Ct associé à un virus cultivable avait une médiane de 30,5 (IC95 % : 26,3-34). Les Ct étaient plus élevés chez les patients immunodéprimés avec une médiane de 32,5 (IC95 % : 20–37,8). La présence de virus viable chez certains patients qui avaient une faible charge virale dans les écouvillons nasopharyngés

est surprenante. Une explication potentielle peut résider dans la présence d'une faible charge virale dans les voies respiratoires supérieures couplée à une charge plus élevée dans les voies respiratoires inférieures. Alternativement, un problème d'échantillonnage peut être supposé.

Ces données ont eu un impact réel sur la prise en charge de nos patients transplantés. Nous avons prolongé les précautions d'isolement chez nos patients transplantés : (1) jusqu'à la résolution clinique des symptômes et une recherche du SARS-CoV-2 par RT-PCR dans des prélèvements respiratoires négative ou (2) au moins 30 jours à compter de l'apparition des symptômes lorsque le test RT-PCR n'est pas disponible. Il est également possible que l'excrétion prolongée de SARS-CoV-2 viable chez les patients immunodéprimés à faible pression immunologique puisse conduire à l'émergence de VOC comme discuté en introduction.

La charge virale nasopharyngée n'était pas prédictive de la gravité de la maladie dans notre cohorte. Dans la littérature, les résultats sont discordants sur ce point. Une méta-analyse de trente-quatre études et de 1015 patients n'était pas concluante quant à la relation entre la gravité du COVID-19 et la charge virale, car un nombre similaire d'études soutenaient ou écartaient cette hypothèse.<sup>614</sup> Il est essentiel de considérer que les valeurs de charge virale peuvent être affectées par des variables pré-analytiques, analytiques et post-analytiques telles que la technique de prélèvement, le type d'échantillon, les conditions de transport et de stockage, l'extraction d'acide nucléique et la méthode de détermination de la valeur Ct.<sup>615</sup>

À l'inverse, dans notre étude, l'ARNémie est associée à la gravité de la maladie et à la mortalité chez les patients transplantés. Cependant, les données publiées sur le sujet sont mitigées. De nombreuses études chez l'immunocompétent rapportent la même observation<sup>365,616,617</sup> mais certaines ne trouvent pas cette association.<sup>618,619</sup> Le mécanisme physiopathologique de l'association entre la sévérité du COVID-19 et la charge virale plasmatique n'est toujours pas

clair ; l'une des hypothèse est que le SRC pourrait augmenter l'ARNémie par une augmentation de la perméabilité vasculaire, ou alors une charge virale sanguine importante pourrait déclencher la tempête de cytokines.<sup>616</sup> La culture du SARS-CoV-2 à partir d'échantillons de sang présentant de faibles niveaux d'ARN du SARS-CoV-2 n'a pas été possible faisant suspecter la présence de particules virales non viables.<sup>620</sup>












Concernant la réponse humorale, notre étude était la première décrivant l'évolution sur 6 mois des anticorps anti-SARS-CoV-2 dans une population immunodéprimée. L'ensemble des patients survivants ont présenté une séroconversion. Au total, 72,4 % présentaient des anticorps anti-SARS-CoV-2 jusqu'à 6 mois après COVID-19. La cinétique à moyen terme des anticorps était proche de celle observée chez les sujets immunocompétents.<sup>621</sup> Une baisse initiale des titres d'anticorps n'implique pas nécessairement leur disparition. En conséquence, de faibles niveaux d'anticorps peuvent persister pendant plusieurs années, comme cela a déjà été observé pour le SARS-CoV. D'autres études ont montré que les transplantés rénaux sont capables de générer des taux sériques normaux d'IgM, d'IgA et d'IgG et d'anticorps neutralisants anti-SARS-CoV-2 lors de l'infection<sup>621-623</sup>, mais la cinétique de la réponse humorale est retardée par rapport à l'immunocompétent.<sup>621,624</sup> Contrairement à nos données, certaines études ont montré que ces titres diminuent plus rapidement par rapport aux sujets immunocompétents.<sup>625,626</sup> Notre test sérologique mesurait les anticorps anti-N et anti-S en combinaison, alors que ces études n'ont évalué que la cinétique des anti-N. Cette différence peut s'expliquer par le fait que les titres d'anticorps diminuent plus rapidement chez les transplantés par rapport aux immunocompétents en particulier ceux ayant une immunodépression plus élevée,<sup>626,627</sup> suggérant une plus grande sensibilité de la séroconversion et de la cinétique des anti-N à l'immunosuppression chronique. De plus, deux études récentes ont montré que malgré des taux de séropositivité similaires pour les deux antigènes S et N entre patients immunocompétents et patients transplantés, ces derniers ont montré des titres d'IgG anti-N significativement inférieurs

à ceux des patients immunocompétents.<sup>628,629</sup> Le taux d'anticorps anti-S, qui est plus corrélé à l'activité neutralisante que le taux d'anticorps anti-N, persistait jusqu'à M9 dans une de ces études.<sup>629</sup> Nous n'avons pas pu étudier la cinétique des anticorps dans notre cohorte au-delà de 6 mois suite au début de la campagne de vaccination.

Dans cette cohorte, nous n'avons pas eu la possibilité d'étudier l'immunité cellulaire. Dans la littérature, deux études multicentriques ont comparé la réponse immunitaire précoce et jusqu'à 6 mois après un COVID-19 chez des patients transplantés rénaux versus immunocompétents.<sup>621,628</sup> Comme la réponse sérologique, la réponse immunitaire cellulaire précoce est retardée chez le transplanté rénal par rapport à l'immunocompétent mais reste similaire. Le suivi jusqu'à M6, montre une persistance de façon comparable de cette réponse entre les deux populations. L'analyse a été stratifiée selon la sévérité du COVID-19. De manière intéressante, la persistance et l'ampleur de cette réponse étaient principalement influencées par le degré de gravité clinique du COVID-19 ; ainsi, une forte proportion de patients asymptomatiques et certains patients convalescents légers ne présentaient aucune mémoire immunitaire adaptative détectable dans aucun compartiment biologique. La réponse immunitaire semble persister au moins jusqu'à 10 mois post-infection.<sup>630</sup>

La méthodologie, les résultats et la discussion détaillés des trois manuscrits concernant ces résultats sont présentés ci-dessous.

# In-depth virological assessment of kidney transplant recipients with COVID-19

Ilies Benotmane<sup>1,2,3</sup>  | Gabriela Gautier-Vargas<sup>1</sup>  | Marie-Josée Wendling<sup>2</sup> | Peggy Perrin<sup>1,3</sup>  | Aurélie Velay<sup>2,3</sup>  | Xavier Bassand<sup>1</sup> | Dimitri Bedo<sup>1</sup> | Clément Baldacini<sup>1</sup> | Mylène Sagnard<sup>1</sup> | Dogan-Firat Bozman<sup>1</sup> | Margaux Della-Chiesa<sup>1</sup> | Morgane Solis<sup>2,3</sup>  | Floriane Gallais<sup>2,3</sup> | Noëlle Cognard<sup>1</sup>  | Jérôme Olagne<sup>1</sup> | Héloïse Delagrèverie<sup>2</sup>  | Louise Gontard<sup>2</sup> | Baptiste Panaget<sup>2</sup> | David Marx<sup>1</sup>  | Françoise Heibel<sup>1</sup> | Laura Braun-Parvez<sup>1</sup> | Bruno Moulin<sup>1,3</sup>  | Sophie Caillard<sup>1,3,\*</sup>  | Samira Fafi-Kremer<sup>2,3,\*</sup> 

<sup>1</sup>Department of Nephrology and Transplantation, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

<sup>2</sup>Department of Virology, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

<sup>3</sup>INSERM U1109, LabEx TRANSPLANTE, Strasbourg, France

## Correspondence

Samira Fafi-Kremer  
Email: samira.fafi-kremer@unistra.fr

## Funding information

Strasbourg University Hospital (COVID-HUS study-HUS N°7760)

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has spread widely, causing coronavirus disease 2019 (COVID-19) and significant mortality. However, data on viral loads and antibody kinetics in immunocompromised populations are lacking. We aimed to determine nasopharyngeal and plasma viral loads via reverse transcription-polymerase chain reaction and SARS-CoV-2 serology via enzyme-linked immunosorbent assay and study their association with severe forms of COVID-19 and death in kidney transplant recipients. In this study, we examined hospitalized kidney transplant recipients with nonsevere (n = 21) and severe (n = 19) COVID-19. SARS-CoV-2 nasopharyngeal and plasma viral load and serological response were evaluated based on outcomes and disease severity. Ten recipients (25%) displayed persistent viral shedding 30 days after symptom onset. The SARS-CoV-2 viral load of the upper respiratory tract was not associated with severe COVID-19, whereas the plasma viral load was associated with COVID-19 severity ( $P = .010$ ) and mortality ( $P = .010$ ). All patients harbored antibodies during the second week after symptom onset that persisted for 2 months. We conclude that plasma viral load is associated with COVID-19 morbidity and mortality, whereas nasopharyngeal viral load is not. SARS-CoV-2 shedding is prolonged in kidney transplant recipients and the humoral response to SARS-CoV-2 does not show significant impairment in this series of transplant recipients.

## KEYWORDS

clinical research/practice, complication: infectious, immune deficiency, infection and infectious agents – viral, infectious disease, kidney transplantation/nephrology

**Abbreviations:** CNI, calcineurin inhibitor; COVID-19, coronavirus disease 2019; CT, computed tomography; D, day after symptom onset; ICU, intensive care unit; Ig, immunoglobulin; IL, interleukin; KTR, kidney transplant recipients; MPA, mycophenolic acid; ROC, receiver operating characteristic; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

\*Sophie Caillard and Samira Fafi-Kremer contributed equally to this work.

## 1 | INTRODUCTION

In December 2019, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) emerged in China, and it has since spread widely across the world.<sup>1</sup> The resulting coronavirus disease 2019 (COVID-19) has led to a high death toll. Scientific knowledge on SARS-CoV-2 has evolved rapidly since the outbreak, but little is known about responses to the virus in immunocompromised populations. Infection with respiratory viruses has been shown to be particularly concerning in transplant recipients due to prolonged viral shedding and a higher risk of complications.<sup>2,3</sup> However, there have been no reports indicating whether SARS-CoV-2 infection presents the same risks for transplant recipients as other respiratory viruses. Determining viral loads and antibody kinetics in immunocompromised individuals is necessary to protect this highly immunocompromised population. Because prolonged viral shedding and/or a lack of protective immunity could lead to significant viral spread in patients' environments, protective measures may need to be increased.

We thus conducted a retrospective cohort study in kidney transplant recipients (KTR) in Alsace, Grand-Est, France, to determine the dynamics of nasopharyngeal and plasma viral loads and SARS-CoV-2 serology and to study their association with mortality and severe forms of COVID-19.

## 2 | PATIENTS AND METHODS

### 2.1 | Study population

A total of 40 adult KTR hospitalized with COVID-19 were consecutively recruited at our transplant center between March 4 and April 7, 2020. COVID-19 was diagnosed in these patients based on their clinical symptoms and positive reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) results obtained using nasopharyngeal swabs and/or typical lung lesions observed through chest computed tomography (CT). Patient characteristics were retrieved from digital medical records from the day of admission through the date of last follow-up (May 13, 2020). Data for the following parameters were collected: demographic variables, symptoms and time of presentation, immunosuppressive therapy and management, laboratory parameters, chest CT findings, administered drugs, death, and intensive care unit (ICU) admissions. In accordance with the published literature,<sup>4-7</sup> patients were considered to have severe COVID-19 in the presence of at least 1 of the following criteria: oxygen requirement >6 L/min; need for ICU admission; and death. The study protocol was reviewed and approved by the local Institutional Review Board (approval number: DC-2013-1990).

### 2.2 | Virological diagnosis and follow-up of SARS-CoV-2 infection

In keeping with the COVID-HUS study protocol (ClinicalTrials.gov identifier: NCT04405726), quantitative RT-PCR tests for SARS-CoV-2 nucleic acid were performed using nasopharyngeal swabs and plasma samples obtained at admission and on a weekly basis during follow-up

until discharge for all but 1 patient, whose nasopharyngeal swab was collected at another laboratory at the time of diagnosis. Afterward, nasopharyngeal swab testing was performed at 30, 45, and 60 days after the date of symptom onset. Primer and probe sequences targeted 2 regions on the RNA-dependent RNA polymerase gene specific to SARS-CoV-2. SARS-CoV-2 RNA was quantified using serial 10-fold dilutions of SARS-CoV-2 RNA transcript at a concentration of  $10^9$  copies/ $\mu$ L. The assay's sensitivity was  $\approx 10$  RNA copies per reaction. A SARS-CoV-2 RT-PCR result was considered positive when at least 1 of the targets was amplified (Supplementary Material).<sup>8</sup> Viral clearance was defined as at least 1 negative RT-PCR test in nasopharyngeal swabs.

### 2.3 | SARS-CoV-2 serological assessment

Immunoglobulin (Ig) M and IgG antibody responses to SARS-CoV-2 recombinant nucleocapsid and spike antigens were tested using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (DIA. PRO Diagnostic BioProbes Srl, Sesto San Giovanni, Italy) according to the manufacturer's instructions. Antibody levels are presented as measured absorbance values divided by the cut-off. The cut-off value was defined as the mean absorbance values of the 3 negative controls plus 0.250. IgM and IgG specificity and sensitivity reached an overall value of  $\geq 98\%$ . Seronegative patients were negative for IgM and IgG.

### 2.4 | Statistical analysis

Continuous data are presented as medians and interquartile ranges (IQR) and were analyzed using the nonparametric Mann-Whitney *U* test. Categorical variables are expressed as counts and percentages and were compared using the Fisher exact test. The associations between maximum nasopharyngeal and plasma SARS-CoV-2 viral loads and clinical, demographic, and laboratory variables were determined using Spearman's correlation coefficient ( $\rho$ ) values. Receiver operating characteristic (ROC) curves were generated to investigate the viral loads in the upper respiratory tract and plasma with respect to disease severity and mortality. Survival plots of severe COVID-19-free survival and COVID-19-specific survival were graphically represented with Kaplan-Meier curves according to RNAemia (ie, positive plasma viral load), using the log-rank test to compare differences in survival. Patients were censored at the time of last follow-up. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). A *P* value < .05 (2-tailed) was considered statistically significant.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | General characteristics of the study patients

A total of 40 patients were included in this study. Their demographic and clinical characteristics are presented in Table 1. The patients were mainly men (77.5%), with a median age

**TABLE 1** Demographics and clinical characteristics of patients according to disease severity

	All patients (n = 40)	Nonsevere patients (n = 21)	Severe patients (n = 19)	P
Men	31 (77.5%)	19 (90.5%)	12 (63.1%)	.06
Age, y	63.8 [54.6-68.2]	58.4 [50.9-64.3]	65.5 [62.6-69.9]	.02
>60 y	25 (62.5%)	9 (42.9%)	16 (84.2%)	.01
<b>Comorbidities</b>				
BMI, kg/m <sup>2</sup>	29.5 [24-33]	25 [23-32]	31 [27-33]	.07
<25	13 (32.5%)	11 (52.4%)	2 (10.5%)	.02
25-30	8 (20%)	4 (19.1%)	4 (21.1%)	
>30	20 (50%)	7 (33.3%)	13 (68.4%)	
Cardiovascular disease	16 (40%)	8 (38.1%)	8 (42.1%)	1
Respiratory disease	9 (22.5%)	5 (23.8%)	4 (21%)	1
Obstructive sleep apnea	7 (17.1%)	4 (19.1%)	3 (15%)	1
Diabetes	19 (47.5%)	8 (38.1%)	11 (57.9%)	.34
Active cancer	0	0	0	
Hypertension	33 (82.5%)	15 (71.4%)	18 (94.7%)	.09
RAAS inhibitor use	15 (37.5%)	7 (33.3%)	8 (42.1%)	.75
ACE inhibitor use	9 (22.5%)	3 (14.3%)	6 (31.6%)	.26
ARB use	6 (15%)	4 (19.1%)	2 (10.5%)	.66
Interval from kidney transplantation (y)	6.6 [2.8-14.6]	3.8 [2.1-12.6]	7.7 [5.2-14.9]	.22
<b>Immunosuppressive therapy</b>				
<b>Induction immunosuppression</b>				
Anti-thymocyte globulin	18 (43.9%)	10 (47.6%)	8 (42.1%)	.9
Anti-CD25	19 (46.3%)	9 (42.9%)	10 (52.6%)	
No induction	3 (7.3%)	2 (9.5%)	1 (5%)	
<b>Maintenance immunosuppression</b>				
Tacrolimus	21 (52.5%)	10 (47.6%)	11 (57.9%)	.54
Cyclosporin	14 (35%)	7 (33.3%)	7 (36.8%)	1
MMF/MPA	34 (85%)	19 (90.5%)	15 (78.9%)	.40
mTOR inhibitors	6 (15%)	4 (19.1%)	2 (10.5%)	.66
Azathioprine	1 (2.5%)	0	1 (5.3%)	.47
Steroids	23 (57.5%)	12 (57.1%)	11 (57.9%)	1
Belatacept	2 (5%)	2 (9.5%)	0	.49
Eculizumab	1 (2.5%)	0	1 (5.3%)	.47
<b>Clinical symptoms during hospitalization</b>				
Dyspnea	28 (70%)	9 (42.9%)	19 (100%)	<.001
Cough	31 (77.5%)	15 (71.4%)	16 (84.2%)	.46
Fever	38 (95%)	20 (95.2%)	18 (94.7%)	1
Myalgia	22 (55%)	14 (66.7%)	8 (42.1%)	.20
Headache	12 (30%)	9 (42.8%)	3 (15.8%)	.09
Diarrhea	31 (77.5%)	19 (90.5%)	12 (63.2%)	.06
Vomiting	7 (17.5%)	5 (23.8%)	2 (10.5%)	.41
Anosmia/ageusia	8 (20%)	6 (28.6%)	2 (10.5%)	.24
Neurological manifestations	15 (37.5%)	8 (38.1%)	7 (36.9%)	1

Continuous variables are presented as median (interquartile range), whereas categorical variables are presented as count (percentage).

ACE, angiotensin converting enzyme; ARB, angiotensin receptor blockers; BMI, body mass index; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; mTOR, mammalian target of rapamycin; RAAS, renin-angiotensin-aldosterone system.

of 63.8 years (IQR: 54.6-68.2 years) and a median body mass index of 29.5 kg/m<sup>2</sup> (IQR: 24-33 kg/m<sup>2</sup>). The median time after kidney transplantation was 6.6 years (IQR: 2.8-14.6 years). At the time of COVID-19 diagnosis, 35 (87.5%) patients were receiving calcineurin inhibitors (CNI). Mycophenolate mofetil or mycophenolic acid was being taken by 34 patients (85%), mammalian target of rapamycin inhibitors were being administered to 6 (15%) patients, and steroids were taken by 23 (57.5%) patients. The median interval between the onset of symptoms

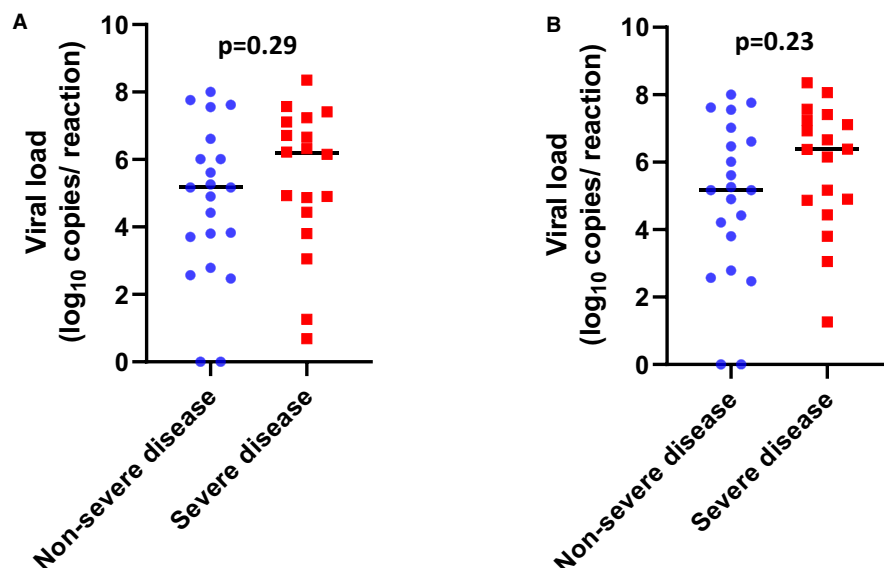
and COVID-19 diagnosis was 4 days (IQR: 3-7 days). All but 2 patients had a fever. Respiratory (n = 34, 85%) and gastrointestinal (n = 31, 77.5%) symptoms were the most common clinical manifestations. Twenty-one patients had a nonsevere clinical presentation, whereas 19 had a severe clinical course. During follow-up, the mortality rate was found to be 22.5% (9/40). The management of immunosuppression and the antiviral and immunomodulatory drugs administered to the study patients upon COVID-19 diagnosis are described in Table 2.

	All patients (n = 40)	Nonsevere patients (n = 21)	Severe patients (n = 19)
Azithromycin	26 (65%)	15 (71.4%)	11 (57.9%)
Other antibiotics	40 (100%)	21 (100%)	19 (100%)
Azole antifungals	1 (2.5%)	0 (0%)	1 (5.3%)
Lopinavir-ritonavir	4 (10%)	1 (4.8%)	3 (15.8%)
Hydroxychloroquine	15 (37.5%)	8 (38.1%)	7 (36.9%)
Tocilizumab	4 (10%)	1 (4.8%)	3 (15.8%)
High-dose corticosteroids <sup>a</sup>	14 (35%)	5 (23.8%)	9 (47.4%)
Management of immunosuppression			
MMF/MPA withdrawal	34/34 (100%)	17 (100%)	15 (100%)
Calcineurin inhibitors withdrawal	15/35 (42.6%)	2 (11.8%)	13 (72.2%)
mTOR inhibitors withdrawal	6/6 (100%)	4 (100%)	2 (100%)
Delayed belatacept administration	1 (2.5%)	1 (4.8%)	0 (0%)

**TABLE 2** Drugs administered to hospitalized patients stratified according to disease severity

MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; mTOR, mammalian target of rapamycin.

<sup>a</sup>High-dose corticosteroids included intravenous dexamethasone and intravenous methylprednisolone. Continuous variables are presented as medians (interquartile ranges), whereas categorical variables are given as counts (percentages).



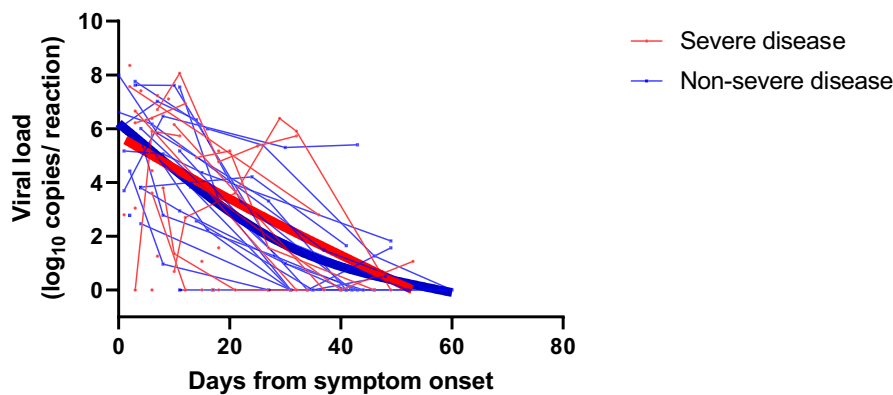
**FIGURE 1** Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 viral load distribution in nasopharyngeal swabs according to disease severity. A, Scatter plots with the medians (black lines) of the viral loads at admission in nonsevere (blue circles) and severe patients (red squares). B, Scatter plots with the medians (black lines) of the maximum viral loads during the follow-up in nonsevere (blue circles) and severe patients (red squares) [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



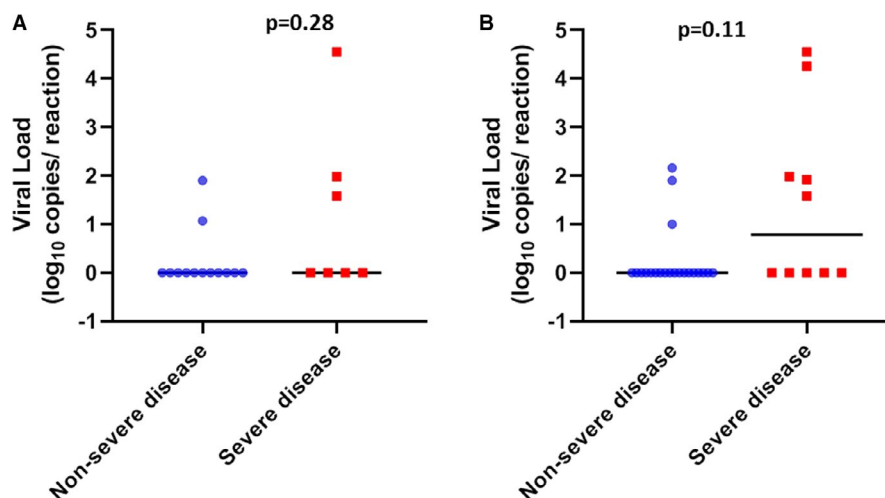
### 3.2 | Viral load in nasopharyngeal swabs

A total of 118 upper respiratory specimens were analyzed (median of 3 swabs per patient [IQR: 2-3 swabs]). The median viral load was  $5.17 \log_{10}$  copies/reaction (IQR: 3.80-6.69) at diagnosis (between day 0 and day 14 after symptom onset). A total of 29 patients (74.4%) had their peak viral load at admission, and 2 patients hospitalized at D10 and D11 after symptom onset had negative RT-PCR results at admission and during the follow-up. In these 2 cases, COVID-19 was initially diagnosed based on the presence of typical pulmonary lesions on chest CT and subsequently confirmed by positive SARS-CoV-2 serology tests. The viral load at admission was not statistically different between severe and non-severe patients ( $6.22 \log_{10}$  copies/reaction vs  $5.17 \log_{10}$  copies/reaction, respectively,  $P = .29$ ) and was not predictive of disease severity (area under the ROC curve = 0.595,  $P = .31$ ) at admission,

at the peak of viral load (Figure 1A,B), or during the course of the disease (Figure 2). Recipient age ( $\rho = 0.23$ ,  $P = .16$ , Figure 3) and sex ( $P = .05$ ) were marginally associated with the viral load. Notably, patients receiving steroid therapy and not presenting gastrointestinal symptoms displayed a higher viral load (Table 3). There was no correlation between the time from symptom onset and viral loads in nasopharyngeal swabs at admission ( $\rho = 0.261$ ,  $P = .11$ ). Similar results were observed for SARS-CoV-2 RNAemia ( $\rho = 0.336$ ,  $P = .15$ ). Moreover, no correlation was evident between maximum viral load and inflammatory markers, including interleukin (IL)-6 ( $\rho = 0.041$ ,  $P = .81$ ) and C-reactive protein ( $\rho = 0.001$ ,  $P = .99$ ). Among patients with an initial positive RT-PCR test result ( $n = 37$ ), no patient showed a viral clearance before D21. Fifteen (38.5%) patients displayed a positive viral load  $>3 \log_{10}$  copies/reaction after D10, and 10 patients (24.4%) showed persistent viral shedding after D30 (Figure 2).



**FIGURE 2** Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 viral load kinetics analyzed using nasopharyngeal swabs. Patients are stratified according to nonsevere disease (blue) and severe disease (red). The thick lines show the trend in viral load using smoothing splines



**FIGURE 3** Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 viral load distribution in plasma according to disease severity. A, Scatter plots with the medians (black lines) of the viral loads at admission in nonsevere (blue circles) and severe patients (red squares). B, Scatter plots with the medians (black lines) of the maximum viral loads during the follow-up in nonsevere (blue circles) and severe patients (red squares) [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

**TABLE 3** SARS-CoV-2 nasopharyngeal viral load in log<sub>10</sub> copies/reaction according to demographic and clinical characteristics of hospitalized kidney transplant recipients (N = 39)

	n	Nasopharyngeal maximal viral load	P
COVID-19 severity			.23
Nonsevere disease	21	5.17 [3.80-6.61]	
Severe disease	18	6.38 [4.88-7.21]	
Recipient age, y			.70
<60	24	5.26 [3.42-6.92]	
≥60	15	5.88 [4.43-7.04]	
Sex			.05
Female	8	7.34 [5.74-8.02]	
Male	31	5.17 [4.32-6.63]	
BMI, kg/m <sup>2</sup>			.08
<30	20	6.50 [5.10-7.32]	
≥30	19	4.90 [3.43-6.42]	
Obstructive sleep apnea			.57
No	32	5.81 [4.71-7.14]	
Yes	7	4.44 [3.50-4.44]	
Cardiovascular disease			.84
No	23	6.01 [4.88-6.84]	
Yes	16	5.04 [3.80-7.50]	
Respiratory disease			.31
No	24	6.26 [4.62-7.28]	
Yes	15	4.90 [4.32-6.70]	
Diabetes			.11
No	21	6.01 [4.90-7.55]	
Yes	18	5.04 [3.24-6.45]	
Hypertension			.84
No	7	5.17 [4.35-6.82]	
Yes	32	5.81 [4.37-7.14]	
RAAS inhibitor			.17
No	25	6.38 [4.90-7.11]	
Yes	14	6.88 [3.34-6.53]	
Immunosuppressive induction therapy			.20
Anti-thymocyte globulin	18	6.38 [2.59-7.61]	
Anti-CD25	18	5.17 [3.96-6.45]	
No induction	3	4.90 [3.85-6.07]	
Immunosuppressive maintenance therapy			.71
CNI			
No	5	4.90 [4.42-7.76]	
Yes	34	5.81 [3.96-7.00]	
MMF/MPA			.15
No	6	7.08 [6.34-7.81]	
Yes	33	5.17 [4.21-6.66]	
mTOR			.92
No	33	5.61 [4.21-7.02]	
Yes	6	5.92 [4.54-7.16]	

(Continues)

TABLE 3 (Continued)

	n	Nasopharyngeal maximal viral load	P
<b>Steroids</b>			
No	17	4.87 [3.05-6.38]	.03
Yes	22	6.50 [5.17-7.53]	
<b>Clinical symptoms</b>			
<b>Dyspnea</b>			
No	12	4.79 [2.73-6.71]	.23
Yes	27	6.15 [4.88-7.17]	
<b>Diarrhea</b>			
No	9	6.93 [6.38-7.41]	.02
Yes	30	5.17 [3.80-7.83]	
<b>Positive RNAemia</b>			
No	18	5.17 [4.26-6.88]	.35
Yes	9	6.61 [5.26-7.24]	

Nasopharyngeal maximal viral load is presented as median (interquartile range).

BMI, body mass index; CNI, calcineurin inhibitor; COVID-19, coronavirus disease 2019; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; mTOR, mammalian target of rapamycin; RAAS, renin-angiotensin-aldosterone system; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

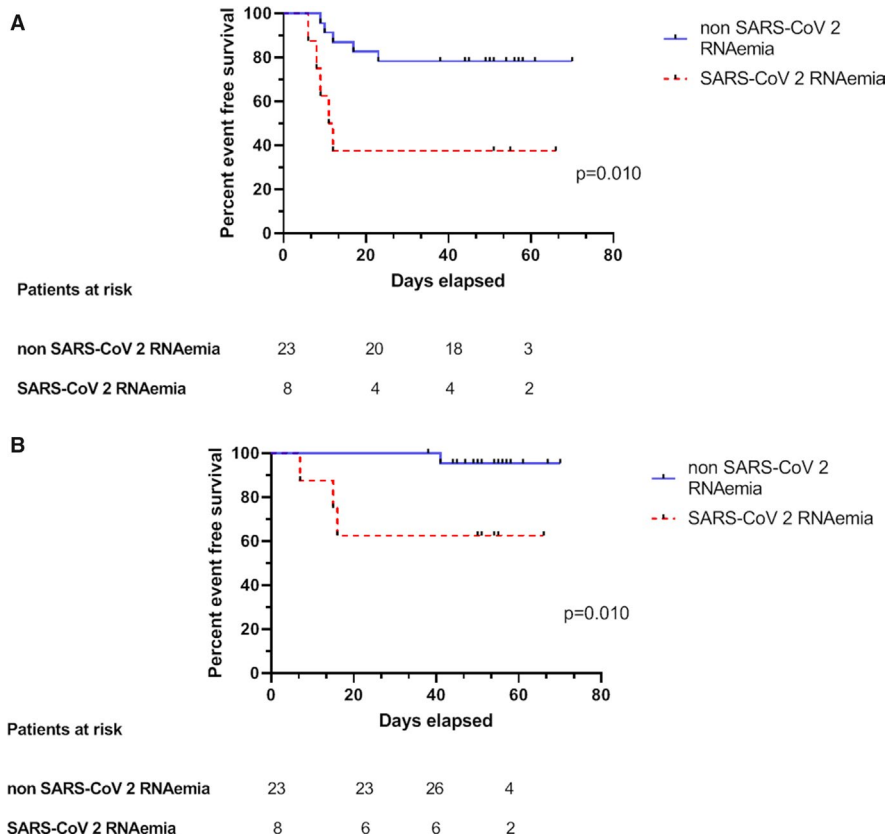
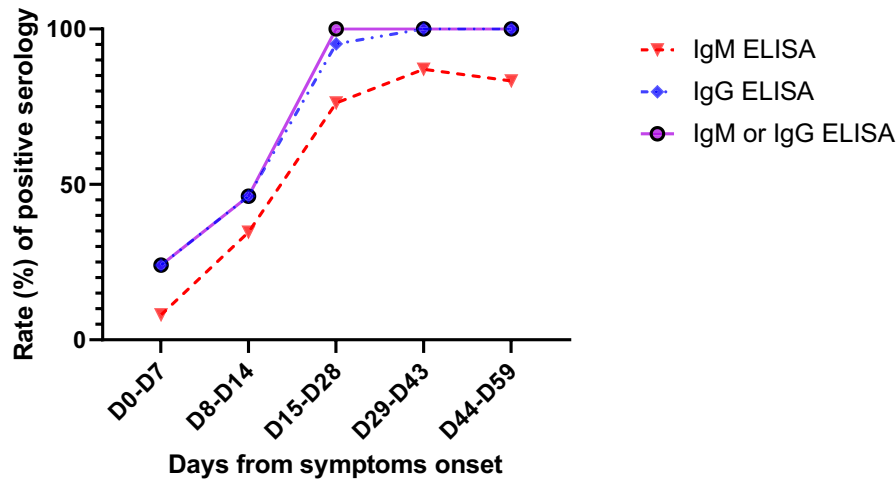


FIGURE 4 Association of positive SARS-CoV-2 RNAemia with COVID-19 severity and mortality. A, Kaplan-Meier plots of COVID-19-free survival according to SARS-CoV-2 RNAemia. Presence of SARS-CoV-2 RNAemia (dotted red curve) vs its absence (solid blue curve),  $P = .010$ . B, Kaplan-Meier plots of severe COVID-19-free survival according to SARS-CoV-2 RNAemia. Presence of SARS-CoV-2 RNAemia (dotted red curve) vs its absence (solid blue curve),  $P = .01$ . COVID-19, coronavirus disease 2019; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

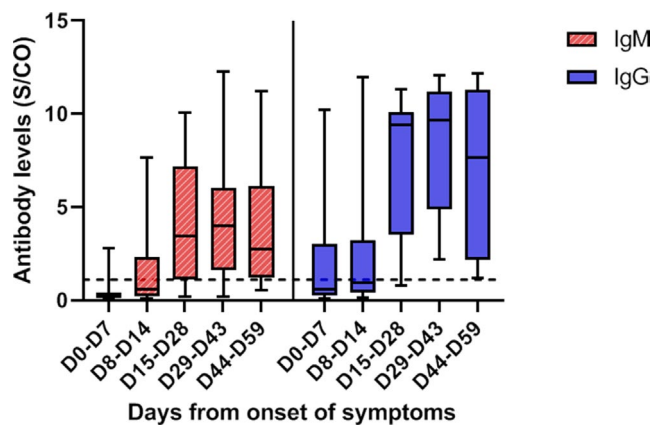


**FIGURE 5** Rate of positive SARS-CoV-2 IgM (dotted red curve with triangles), IgG (dotted blue curve with rhombus), and IgM or IgG (solid purple curve) tested by an ELISA according to the days from symptom onset. A total of 116 samples from 35 patients were tested. From day 15 (D15) onwards, all samples were positive for IgM or IgG. ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ajt.16251)]

### 3.3 | SARS-CoV-2 RNAemia

SARS-CoV-2 loads were measured in 73 plasma samples obtained from 31 patients (21 in the nonsevere group and 10 in the severe group). Plasma viral loads ranged from 1 to 4.55  $\log_{10}$  copies/reaction. Three patients had positive viremia at admission (Figure 3A) and 8 showed at least 1 positive RNAemia during the follow-up period (Figure 3B). Severe patients showed a higher frequency of

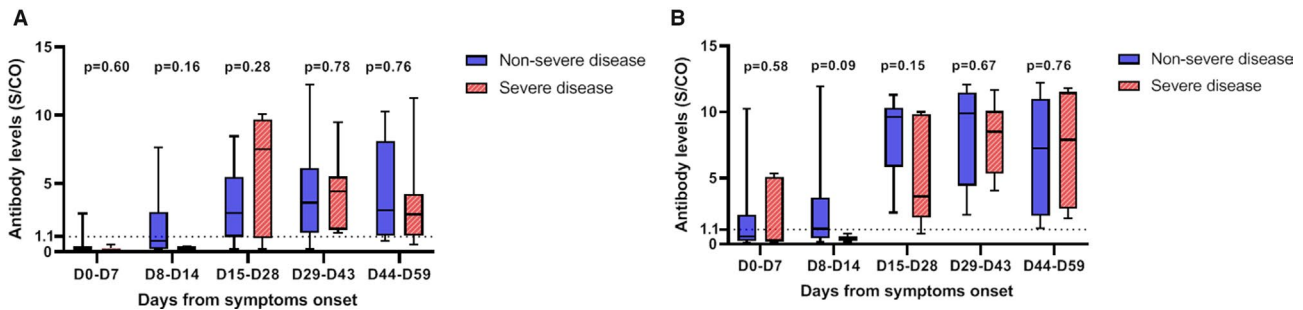
RNAemia compared with nonsevere patients (50% vs 14.3%, respectively,  $P = .01$ , Figure 4A). Moreover, RNAemia was found to be associated with mortality (Figure 4B). Accordingly, RNAemia was positive in 3 of the 4 nonsurvivors tested; in contrast, only 5 of 29 (24%) tested survivors had positive RNAemia ( $P = .035$ ). Furthermore, 2 nonsurvivors harbored high viral loads (4.55  $\log_{10}$  copies/reaction and 4.26  $\log_{10}$  copies/reaction), whereas other patients were characterized by low RNAemia (<2.16  $\log_{10}$  copies/reaction). With regard to immunosuppressive therapy, patients receiving CNi tended to have more positive RNAemia albeit not significantly so (8/26 vs 0/5, respectively,  $P = .29$ ). There were no correlations between SARS-CoV-2 RNAemia and viral loads in nasopharyngeal swabs both at admission ( $\rho = 0.375$ ,  $P = .13$ ) and during follow-up ( $\rho = 0.159$ ,  $P = .41$ ).



**FIGURE 6** SARS-CoV-2 IgM (hatched red plots) and IgG (filled blue plots) titers tested by an ELISA, according to the days from symptom onset. IgM and IgG levels increased significantly over time. Antibody levels are presented as the measured S/CO. The dotted line represents the cutoff value (1.1). The boxplots show medians (middle line) and first and third quartiles (boxes), whereas the whiskers indicate minimum and maximum values. ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; S/CO, absorbance values divided by the cutoff [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ajt.16251)]

### 3.4 | SARS-CoV-2 serological findings

A total of 116 samples from 35 patients were analyzed, with a median of 3 sera tested per patient (IQR: 2-4 sera). All survivors were seropositive at follow-up. Four nonsurvivors had negative serology at their time of death, which occurred on D7, D10, D15, and D16. The 2 patients with a negative SARS-CoV-2 RT-PCR result had positive serology, with 1 patient showing positive serology at the time of diagnosis. Among the 25 samples tested before D8, 6 (24%) were seropositive, whereas all samples tested after D14 were seropositive (Figure 5). The kinetics of the antibodies showed that a stable titer of IgG antibodies was maintained until D59, suggesting persistence of immunity for at least until 2 months after infection (Figure 6). Notably, IgM and IgG antibody levels and delays in seroconversion were not correlated with COVID-19 severity (Figure 7A,B).



**FIGURE 7** Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 IgM (A) and IgG (B) titers tested by an enzyme-linked immunosorbent assay according to the days from symptom onset and stratified by disease severity (severe [hatched red plots] vs nonsevere [filled blue plots]). IgM and IgG antibody levels did not differ according to disease severity ( $P > .05$ ). Antibody levels are presented as the measured S/CO. The dotted line represents the cutoff value (1.1). The boxplots show medians (middle line) and first and third quartiles (boxes), whereas the whiskers indicate minimum and maximum values. S/CO, absorbance values divided by the cutoff [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

## 4 | DISCUSSION

In this retrospective study conducted in a sample of 40 immunocompromised KTR hospitalized for COVID-19, we precisely determined the temporal evolution of nasopharyngeal and plasma SARS-CoV-2 loads, as well as the serological response to the virus. All parameters were correlated with patient characteristics, disease severity, and clinical outcomes. In our study, the viral load in the respiratory specimens of most patients was at the peak at the time of diagnosis. This finding is in line with those previously reported for the general population.<sup>9-11</sup> Based on the data we analyzed, the viral load at the time of diagnosis did not predict the severity of the disease. Moreover, viral loads were not related to inflammatory markers that have been previously associated with COVID-19 severity.<sup>12</sup> Reports on the relationship between viral load and disease severity are contradictory; 3 studies showed no correlation between the severity of the disease and the viral load in respiratory specimens,<sup>10,11,13</sup> whereas Liu et al<sup>14</sup> described a higher viral load in patients with more severe disease.

In our immunocompromised population with a median follow-up of 53 days, the duration of viral detection in the respiratory tract was longer compared to that in the general population. More than a third of our patients displayed a high viral load after D10. Furthermore, almost a quarter of them still had viral shedding at D30; in contrast, in immunocompetent populations, the median duration of viral shedding was 20 days.<sup>15</sup> Isolation was stopped after 2 consecutively negative RT-PCR tests in nasopharyngeal swabs. Notably, this approach generally resulted in prolonged isolation periods. Only 8 of the 40 study patients had evidence of 2 consecutively negative RT-PCR tests in nasopharyngeal swabs during follow-up (median duration: 53 days). These figures seem longer than those reported for the general population. Notably, the Centers for Disease Control and Prevention recommend 10-day isolation for the immunocompetent population.<sup>16</sup> Thus, even if a positive RT-PCR result does not indicate an infectious virus, we should be cautious about viral spread in immunocompromised populations and extend isolation after a SARS-CoV-2 infection.

SARS-CoV-2 RNAemia was positive in 32% of our KTR with COVID-19. To our knowledge, SARS-CoV-2 RNAemia in immunocompromised patients had not been previously described. Nonetheless, this finding is in accordance with what was observed in the general population (ranging from 10.4% to 41% positivity for RNAemia).<sup>12,15,17</sup> Our study shows that RNAemia is associated with disease severity and mortality in KTR patients. However, published data on the subject are mixed. In studies conducted by Huang et al<sup>15</sup> and Zheng et al,<sup>17</sup> RNAemia was not associated with COVID-19 severity, whereas in the cohort study carried out by Chen et al,<sup>12</sup> positive RNAemia was correlated with highly elevated IL-6 plasma level and was only detected in critically ill patients. In the study by Hadjadj et al,<sup>13</sup> patients with severe and critical COVID-19 had higher plasma viral loads than those with mild and moderate disease. The pathophysiological mechanism of the association between COVID-19 severity and plasma viral load is still unclear; perhaps the cytokine storm that affects COVID-19 severity could enhance RNAemia by causing increased vascular permeability, or a significant viral load could trigger the cytokine storm.<sup>12</sup>

Regarding the SARS-CoV-2 humoral response, this is the largest study with the longest follow-up in an immunocompromised population. All but 4 patients had positive serology during the follow-up. The 4 negative patients were tested early in the course of the disease and died shortly after. A total of 13 (43.3%) patients displayed positive serology before D15, supporting the potential usefulness of serology tests for acute diagnosis. All patients harbored SARS-CoV-2 antibodies from D15 onwards. Data on the serological response to SARS-CoV-2 in immunocompromised populations remain scanty. In a study from the United States, 9 patients infected with SARS-CoV-2 after a solid organ transplant had positive IgG serology, with a delay of seroconversion between D6 and D27.<sup>18</sup> Zhao et al<sup>19</sup> reported a delayed antibody response in a patient co-infected with COVID-19, HIV, and hepatitis C. In the general population, studies have reported seroconversion for all patients between the third and fourth week after symptom onset, which is concordant with our findings. These results suggest that the anti-SARS-CoV-2 humoral response is not significantly impaired in our immunocompromised population.<sup>20-22</sup> Notably, the delay after transplantation was long in our cohort, and only 1 patient had undergone

depleting induction therapy during the year preceding COVID-19. The level of IgG remained steady until 2 months after onset of symptoms. Although the neutralizing effect of the antibodies was not studied here, it is encouraging that IgG levels are correlated with a neutralizing effect in the general population.<sup>10,20</sup>

To our knowledge, this is the first report that provides a precise assessment of SARS-CoV-2 virological and antibody response kinetics in an immunocompromised population, with a follow-up for 2 months after symptom onset. However, several caveats need to be considered. First, the small sample size poses a limitation regarding the ability to generalize our conclusions. Second, the lack of data from some patients represents a potential bias. Finally, retrospective cohort studies are prone to unavoidable confounding or residual confounding on unmeasured variables.

In summary, our data indicate that (1) SARS-CoV-2 shedding from the upper respiratory tract is prolonged in KTR patients, indicating the requirement for prolonged protective measures for these patients; (2) the SARS-CoV-2 plasma load is associated with COVID-19 severity and mortality, whereas the viral load of the upper respiratory tract is not; and (3) based on the presence of antibodies in all samples collected by us after the second week of symptom onset, the SARS-CoV-2 humoral response in our immunocompromised population does not show serious impairment and the antibodies persist until 2 months after COVID-19 symptom onset.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Strasbourg University Hospital (COVID-HUS study-HUS N°7760).

#### DISCLOSURE

The authors of this manuscript have conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*. Dr Caillard reports personal fees and nonfinancial support from Novartis, nonfinancial support from Sanofi, and nonfinancial support from Astellas, unrelated to the current study. The other authors have no conflicts of interest to disclose.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data supporting the findings from this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

#### ORCID

Ilies Benotmane  <https://orcid.org/0000-0001-9113-2479>

Gabriela Gautier-Vargas  <https://orcid.org/0000-0001-9377-1055>

Peggy Perrin  <https://orcid.org/0000-0001-7343-5943>

Aurélien Velay  <https://orcid.org/0000-0002-9174-8959>

Morgane Solis  <https://orcid.org/0000-0002-1769-2889>

Noëlle Cognard  <https://orcid.org/0000-0001-6602-2059>

Héloïse Delagrèverie  <https://orcid.org/0000-0001-8700-9996>

David Marx  <https://orcid.org/0000-0002-5804-671X>

Bruno Moulin  <https://orcid.org/0000-0001-6772-7165>

Sophie Caillard  <https://orcid.org/0000-0002-0525-4291>

Samira Fafi-Kremer  <https://orcid.org/0000-0003-3886-7833>

#### REFERENCES

- Zhu NA, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020;382(8):727-733.
- Manuel O, Estabrook M. RNA respiratory viral infections in solid organ transplant recipients: guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant*. 2019;33(9):e13511.
- van de Veerdonk FL, Kolwijck E, Lestrade PPA, et al. Influenza-associated aspergillosis in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;196(4):524-527.
- Anesi GL. Coronavirus-disease-2019-covid-19-critical-care-and-airway-management-issues. <https://www.uptodate.com/contents/coronavirus-disease-2019-covid-19-critical-care-and-airway-management-issues>. Published July 15, 2020. Accessed July 20, 2020.
- Uniformed Services University of the Health Sciences. DoD COVID-19 Practice Management Guide. [https://www.usuhs.edu/sites/default/files/media/vpe/pdf/dod\\_covid-19\\_pmg14may20acc.pdf](https://www.usuhs.edu/sites/default/files/media/vpe/pdf/dod_covid-19_pmg14may20acc.pdf). Published May 14, 2020. Accessed July 20, 2020.
- Rabec C, Gonzalez-Bermejo J. Procedure for the pulmonary management of non-ICU patients hospitalized in the context of the COVID-19 pandemic. <http://splf.fr/wp-content/uploads/2020/04/RespiPreREA-SPLF-GAVO2avril2020-english-version-r.pdf>. Published April, 2020. Accessed July 20, 2020.
- Rilinger J, Kern WV, Duerschmied D, et al. A prospective, randomised, double blind placebo-controlled trial to evaluate the efficacy and safety of tocilizumab in patients with severe COVID-19 pneumonia (TOC-COVID): a structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*. 2020;21(1):470.
- World Health Organization. Molecular assays to diagnose COVID-19: summary table of available protocols. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>. Published January 24, 2020. Accessed June 6, 2020.
- Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020;581(7809):465-469.
- To K-W, Tsang O-Y, Leung W-S, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(5):565-574.
- He X, Lau EHY, Wu P, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med*. 2020;26(5):672-675.
- Chen X, Zhao B, Qu Y, et al. Detectable serum SARS-CoV-2 viral load (RNAemia) is closely correlated with drastically elevated interleukin 6 (IL-6) level in critically ill COVID-19 patients [published online ahead of print 2020]. *Clin Infect Dis*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa449>
- Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science*. 2020;369(6504):718-724. <https://doi.org/10.1126/science.abc6027>
- Liu Y, Yan L-M, Wan L, et al. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(6):656-657.
- Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497-506.
- CDC. Discontinuation of Isolation for Persons with COVID-19 Not in Healthcare Settings. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/disposition-in-home-patients.html>. Update July 17, 2020. Accessed July 20, 2020.
- Zheng S, Fan J, Yu F, et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study. *BMJ*. 2020;2020:369.



18. Fung M, Chiu CY, DeVoe C, et al. Clinical outcomes and serologic response in solid organ transplant recipients with COVID-19: a case series from the United States. *Am J Transplant*. 2020;1-9. <https://doi.org/10.1111/ajt.16079>
19. Zhao J, Liao X, Wang H, et al. Early virus clearance and delayed antibody response in a case of coronavirus disease 2019 (COVID-19) with a history of coinfection with human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus [published online ahead of print 2020]. *Clin Infect Dis*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa408>
20. Fafi-Kremer S, Bruel T, Madec Y, et al. Serologic responses to SARS-CoV-2 infection among hospital staff with mild disease in eastern France. *EBioMedicine*. 2020;1029.15. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102915>
21. Xiang F, Wang X, He X, et al. Antibody detection and dynamic characteristics in patients with COVID-19 [published online ahead of print 2020]. *Clin Infect Dis*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa461>
22. Long Q-X, Liu B-Z, Deng H-J, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med*. 2020;26(6):845-848.




#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** Benotmane I, Gautier-Vargas G, Wendling M-J, et al. In-depth virological assessment of kidney transplant recipients with COVID-19. *Am J Transplant*. 2020;20:3162-3172. <https://doi.org/10.1111/ajt.16251>

## BRIEF COMMUNICATION

# Long-term shedding of viable SARS-CoV-2 in kidney transplant recipients with COVID-19

Ilies Benotmane<sup>1,2,3</sup>  | Simone Risch<sup>2</sup> | Cécile Doderer-Lang<sup>4</sup> | Sophie Caillard<sup>1,3</sup>  | Samira Fafi-Kremer<sup>2,3</sup> 

<sup>1</sup>Department of Nephrology and Transplantation, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

<sup>2</sup>Department of Virology, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

<sup>3</sup>Fédération de Médecine Translationnelle (FMTS), Strasbourg, France

<sup>4</sup>UR7292 Institute of Parasitology and Tropical Diseases of Strasbourg, Strasbourg University, Strasbourg, France

## Correspondence

Ilies Benotmane, Department of Nephrology and Transplantation, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France.  
Email: Ilies.benotmane@chru-strasbourg.fr

## Funding information

Hôpitaux universitaires de Strasbourg

The exact duration of viable SARS-CoV-2 shedding in kidney transplant recipients (KTRs) remains unclear. Here, we retrospectively investigated this issue using cell cultures of SARS-CoV-2 RT-PCR-positive nasopharyngeal samples ( $n = 40$ ) obtained from 16 KTRs with symptomatic COVID-19 up to 39 days from symptom onset. A length of viable SARS-CoV-2 shedding >3 weeks from the onset of symptoms was identified in four KTRs (25%). These results suggest that a significant proportion of KTRs can shed viable SARS-CoV-2 for at least 3 weeks, which may favor the emergence of new variants. Based on these data, we recommend prolonging the isolation of KTRs with COVID-19 until negative SARS-CoV-2 RT-PCR testing.

## KEYWORDS

clinical research/practice, complication: infectious, infection and infectious agents - viral, infectious disease, kidney transplantation/nephrology, translational research/science

## 1 | INTRODUCTION

Immunocompetent individuals with non-severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) may shed SARS-CoV-2 for up to 10 days.<sup>1,2</sup> Understanding whether immunocompromised kidney transplant recipients (KTRs) with COVID-19 may experience prolonged viral shedding has important public health implications, especially with respect to patient isolation. A previous study demonstrated that SARS-CoV-2 ribonucleic acid (RNA) was detectable for a longer period in nasopharyngeal swabs collected from KTRs than in those from immunocompetent individuals.<sup>3</sup> However, the presence of SARS-CoV-2 RNA does not necessarily indicate that the virus is vital and infectious. As a result, limited data are available on the shedding dynamics of viable SARS-CoV-2 in KTRs. Here, we retrospectively investigated this issue using cell cultures of SARS-CoV-2 RT-PCR-positive nasopharyngeal samples ( $n = 40$ ) obtained from 16 KTRs with symptomatic COVID-19 up to 39 days from symptom onset.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Study population

The study participants ( $n = 16$ ) were retrospectively recruited from among adult KTRs who were hospitalized with symptomatic COVID-19 at our transplant center between March 4 and April 15, 2020. All KTRs had an objectively confirmed diagnosis of COVID-19 based on positive testing of nasopharyngeal swabs by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). KTRs who had at least two positive nasopharyngeal swabs (of which one collected at least 7 days after symptom onset) during the follow-up period were deemed eligible. Patient data were extracted from medical records on admission and during follow-up. Patients requiring high concentrations of oxygen (>6 L/min) or admitted to an intensive care unit were considered to have severe COVID-19. The study protocol complied with the tenets of the Helsinki Declaration and was granted

**Abbreviations:** CNI, calcineurin inhibitors; COVID-19, coronavirus disease 2019; Ct, cycle threshold; IQR, interquartile range; KTR, kidney transplant recipients; RDRP, RNA-dependent RNA polymerase; RNA, ribonucleic acid; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction.

© 2021 The American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.



ethical approval by the local Institutional Review Board (approval number: DC-2013-1990).

## 2.2 | Reverse transcription-polymerase chain reaction

Quantitative RT-PCR testing for SARS-CoV-2 was carried out according to the COVID-HUS study protocol (ClinicalTrials.gov identifier: NCT04405726) using nasopharyngeal swabs obtained at admission and, subsequently, on a weekly basis until discharge. Thereafter, RT-PCR testing was performed at 30 and 45 days ( $\pm 7$  days) from the onset of symptoms. We used an in-house RT-PCR-based assay targeting two different regions of the RNA-dependent RNA polymerase (*RdRp*) gene in accordance with the WHO technical guidance. Viral loads were quantified using the cycle threshold (Ct) values of the *RdRp* gene.

## 2.3 | Cell infection and assessment of viral cytopathic effect

Viral cytopathic effect assays were performed using the Buffalo green monkey kidney (BGMK) cell line (ATCC; PTA-4594). In brief, filtered SARS-CoV-2 RT-PCR-positive nasopharyngeal samples (50  $\mu$ L) were added in duplicate to BGMK cells seeded in a 96-well plate and cultured at 37°C for 72 h in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cultures were observed daily for cytopathic effects. On the third day, cells were fixed and probed with a recombinant rabbit anti-SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike S2 antibody (Interchim). Foci were counted on an AID ELISPOT reader using the ELISPOT 8.0 software (AID Autoimmun Diagnostika GmbH) as previously described.<sup>4</sup> All experiments were carried out in a biosafety level-3 laboratory.

## 3 | RESULTS

The study sample consisted of 16 KTR (88% men; median age: 63.3 years; interquartile range [IQR]: 54–68.7 years). The median body mass index was 24 kg/m<sup>2</sup> (IQR: 23–30.8 kg/m<sup>2</sup>), whereas the median time elapsed from the date of transplantation to the diagnosis of COVID-19 was 3.8 years (IQR: 1.6–7.2 years). With respect of immunosuppressive drugs, 13 (81.3%) and 14 (87.5%) patients received calcineurin inhibitors (CNI) and mycophenolate mofetil/mycophenolic acid, respectively. Inhibitors of the mammalian target of rapamycin and steroids were given to 2 (12.5%) and 10 (62.5%) patients, respectively. Only two patients presented with severe COVID-19. Clinical and demographic characteristics are summarized in Table 1.

From symptom onset until 38 days thereafter, we collected a median of two nasopharyngeal swabs per patient (IQR: 2–3.3). Viable SARS-CoV-2 shedding was identified in a total of 17 (42.5%) swabs and 9 (56.2%) KTRs showed at least one positive virus isolation. Most (9/16, 56.2%) samples collected within 10 days of symptom

onset had positive viral cultures of SARS-CoV-2. Notably, a viable virus was detected in 8 of the 24 (33.3%) samples collected after at least 10 days from symptom onset. In addition, a length of viable SARS-CoV-2 shedding >3 weeks from the onset of symptoms was identified in four KTRs (25%; Figure 1, panels A and B). While none of these four patients had severe COVID-19, high viral loads were noted in their nasopharyngeal swabs on admission (24, 21, 16, and 17 Ct), respectively; median in the remaining 12 patients: 26 Ct, IQR: 23–30 Ct. Moreover, they showed lower C-reactive protein peak levels (36, 17, 5, 33 mg/L, respectively; median in the remaining 12 patients: 62 mg/L, IQR: 44–96 mg/L,) and had a trend toward lower lymphocyte counts before COVID-19 (0.66, 0.85, 0.84, and  $0.88 \times 10^9/L$ , respectively; median in the remaining 12 patients:  $1.16 \times 10^9/L$ , IQR:  $0.85$ – $1.94 \times 10^9/L$ ). Other patient characteristics in relation to viable SARS-CoV-2 shedding duration are summarized in Table 1.

## 4 | DISCUSSION

Using *in vitro* cell cultures, we demonstrate that a significant proportion of KTRs with COVID-19 can have a prolonged SARS-CoV-2 shedding period. A positive cytopathic effect in cell cultures can be considered as a surrogate for the presence of a viable virus with infectious potential. Previous studies have shown that viral shedding in immunocompetent subjects is generally limited to less than 10 days from symptom onset,<sup>1,2</sup> although one report found a duration of up to 20 days.<sup>5</sup> Another investigation suggested that the length of viral shedding in immunocompetent patients may be dependent on the severity of COVID-19—being as high as 32 days in those with severe clinical manifestations.<sup>6,7</sup> Herein, we identified four KTRs with a shedding of viable SARS-CoV-2 longer than 3 weeks from symptom onset (up to 38 days). While none of these patients had severe COVID-19, they showed higher viral loads in their nasopharyngeal swabs. Moreover, they had less severe inflammation—possibly as a result of a reduced immune response to SARS-CoV-2. In a patient with mild COVID-19 who had recently undergone heart transplantation, Decker et al.<sup>8</sup> identified viral shedding after 21 days from symptom onset. Another study conducted in 20 patients under immunosuppressive therapy for cancer reported prolonged viral shedding up to 61 days from the onset of symptoms.<sup>9</sup> Currently, the European Center for Disease Prevention and Control guidelines for immunocompromised patients with COVID-19 recommend discontinuing isolation in the following conditions: (1) clinical resolution of symptoms; (2) isolation for at least 20 days from the onset of symptoms; or (3) two consecutive negative SARS-CoV-2 RT-PCR tests of respiratory specimens collected  $\geq 24$  h apart. The Centers for Disease Control and Prevention guidance regarding discontinuing transmission-based precautions in this population maintains that isolation should end (1) 20 days after the symptoms first appeared, (2) at least 24 h have passed since last fever, and (3) when symptoms have improved.<sup>10,11</sup> Based on the current data, we believe that an extension of isolation precautions

**TABLE 1** Clinical and demographic characteristics, management of immunosuppression, and antiviral and immunomodulatory therapies of kidney transplant recipients ( $n = 16$ )

	Entire cohort ( $n = 16$ )	Viable SARS-CoV-2 shedding <21 days ( $n = 12$ )	Viable SARS-CoV-2 shedding >21 days ( $n = 4$ )
Men	14 (87.5%)	11 (91.7%)	3 (75%)
Age (years)	63.3 (54–68.8)	63.3 (57.3–68.7)	58.4 (44.3–68.8)
Comorbidities			
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24 (23–30.8)	26.5 (23–33)	24 (22.5–24.3)
Cardiovascular disease	6 (37.5%)	5 (41.7%)	1 (25%)
Respiratory disease	6 (37.5%)	5 (41.7%)	1 (25%)
Diabetes	6 (37.5%)	5 (41.7%)	1 (25%)
Hypertension	13 (81.3%)	11 (91.7%)	2 (50%)
Interval from kidney transplantation (years)	3.8 (1.6–7.2)	4.9 (1.4–12.8)	2.9 (1.8–3.8)
Antithymocyte globulin	8 (50%)	5 (41.7%)	3 (75%)
Anti-CD25	8 (50%)	7 (58.3%)	1 (25%)
Tacrolimus	10 (62.5%)	8 (66.7%)	2 (50%)
Ciclosporin	3 (18.8%)	1 (8.3%)	2 (50%)
MMF/MPA	14 (87.5%)	11 (91.7%)	3 (75%)
mTOR inhibitors	2 (12.5%)	1 (8.3%)	1 (25%)
Steroids	10 (62.5%)	6 (50%)	4 (50%)
Belatacept	2 (12.5%)	2 (16.7%)	0
Dyspnea	9 (56.3%)	8 (66.7%)	1 (25%)
Cough	12 (75%)	9 (75%)	3 (75%)
Fever	15 (93.8%)	11 (91.7%)	4 (100%)
Myalgia	10 (62.5%)	7 (58.3%)	3 (75%)
Headache	6 (37.5%)	4 (33.3%)	2 (50%)
Diarrhea	14 (87.5%)	10 (83.3%)	4 (100%)
SARS-CoV-2 Ct <sup>a</sup>	25 (22–29)	26 (23–30)	20 (16–24)
CRP peak, mg/L	46 (28.9–76.8)	61.5 (43.7–95.5)	24.8 (13.7–33.9)
Severe disease	2 (12.5%)	2 (16.7%)	0
Lopinavir/ ritonavir	1 (6.3%)	1 (8.3%)	0
Hydroxychloroquine	8 (50%)	5 (41.7%)	3 (75%)
Tocilizumab	2 (12.5%)	2 (16.7%)	0
CNI withdrawal	4/13 (30.1%)	3 (33.3%)	1 (25%)
MMF/MPA withdrawal	14/14 (100%)	11 (100%)	3 (100%)
mTORi withdrawal	2/2 (100%)	1 (100%)	1 (100%)

Continuous variables are presented as medians (interquartile ranges), whereas categorical variables are presented as counts (percentages).

Abbreviations: BMI, body mass index; CNI, calcineurin inhibitors; CRP, C-reactive protein; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; mTORi, inhibitors of the mammalian target of rapamycin.

<sup>a</sup>SARS-CoV-2 cycle threshold measured in the nasopharyngeal swab obtained on admission.

should be considered for KTRs. It is also possible that a prolonged shedding of viable SARS-CoV-2 in immunocompromised patients with a weak immunological pressure can lead to the emergence of viral variants.<sup>12–14</sup> Surprisingly, we identified viable SARS-CoV-2 shedding in three cases characterized by low viral loads (Ct  $\geq$  35). While the presence of a viable virus generally shows an inverse relationship with Ct, this is not invariably the case. For example, a previous study demonstrated a successful viral propagation in 5 of 60 samples with Ct > 35,<sup>15</sup> a finding which has been independently

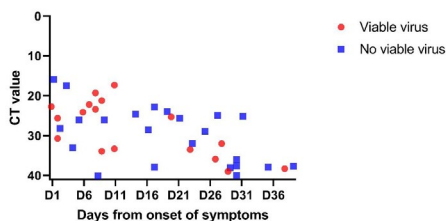
confirmed by another report (for 2 of the 74 specimens with Ct > 35).<sup>16</sup> The presence of positive cultures in certain patients who had a low viral load in nasopharyngeal swabs is surprising. A potential explanation may lie in the presence of a low viral load in the upper respiratory tract coupled with a higher load in the lower tract. Alternatively, a sampling issue can be hypothesized.

In conclusion, our results indicate that a significant proportion of KTRs can shed viable SARS-CoV-2 for at least 3 weeks. Based on these findings, we also suggest prolonging the isolation of KTRs with

## (A)

Patient ID	Days from symptoms onset	SARS-CoV-2 culture
KTR 1	5	-
	14	-
KTR 2	21	-
	29	-
KTR 3	25	-
	39	-
KTR 4	2	+
	9	-
	16	-
	35	-
KTR 5	1	+
	8	+
	23	-
	30	-
KTR 6	6	+
	9	+
	23	+
	29	+
KTR 7	7	+
	38	+
KTR 8	1	-
	8	+
	28	+
KTR 9	11	+
	30	-
KTR 10	2	-
	8	-
KTR 11	11	+
	27	+
KTR 12	17	-
	27	-
KTR 13	2	+
	9	+
	31	-
KTR 14	3	-
	19	-
KTR 15	4	-
	17	-
KTR 16	20	+
	30	-

## (B)



COVID-19 in the following conditions: (1) until clinical resolution of symptoms and negative SARS-CoV-2 RT-PCR testing of respiratory specimens or (2) after at least 30 days from symptom onset when

**FIGURE 1** Duration of viral shedding in kidney transplant recipients ( $n = 16$ ). (A) Results of viral culture in relation to the days from symptom onset for each kidney transplant recipient. A total of 40 nasopharyngeal specimens from 16 recipients were analyzed. Each sample was tested with (1) an RT-PCR-based assay targeting two different regions of the RNA-dependent RNA polymerase (*RdRp*) gene in accordance with the WHO technical guidance and (2) SARS-CoV-2 viral cell culture. Four patients (KTR6, KTR7, KTR8, and KTR11) were found to shed viable SARS-CoV-2 for at least 3 weeks from the onset of symptoms. (B) Presence (red dots) or absence (blue dots) of viable SARS-CoV-2 shedding (based on the results of viral culture) in relation to cycle threshold (CT) values and days after symptoms onset (DSO). KTR, kidney transplant recipient; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; SARS-CoV-2, severe acute respiratory distress syndrome coronavirus 2; WHO, World Health Organization [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](https://onlinelibrary.wiley.com)]

RT-PCR testing is not available. The main caveats of the current study include the limited sample size and the lack of data concerning viral variants; therefore, our findings require confirmation in independent investigations.

## ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by the Strasbourg University Hospital (COVID-HUS study-HUS N°7760).

## DISCLOSURE

The authors of this manuscript have conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*. Dr Caillard reports personal fees and non-financial support from Novartis, nonfinancial support from Sanofi, and nonfinancial support from Astellas, unrelated to the current study. The other authors have no conflicts of interest to disclose.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data supporting the findings from this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## ORCID

Ilies Benotmane [ID https://orcid.org/0000-0001-9113-2479](https://orcid.org/0000-0001-9113-2479)

Sophie Caillard [ID https://orcid.org/0000-0002-0525-4291](https://orcid.org/0000-0002-0525-4291)

Samira Fafi-Kremer [ID https://orcid.org/0000-0003-3886-7833](https://orcid.org/0000-0003-3886-7833)

## REFERENCES

1. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020;581:465-469.
2. Kim M-C, Cui C, Shin K-R, et al. Duration of culturable SARS-CoV-2 in hospitalized patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021;384:671-673.
3. Benotmane I, Gautier-Vargas G, Wendling M-J, et al. In-depth virological assessment of kidney transplant recipients with COVID-19. *Am J Transplant*. 2020;20:3162-3172.
4. Auerswald H, de Jesus A, Seixas G, et al. First dengue virus seroprevalence study on Madeira Island after the 2012 outbreak indicates unreported dengue circulation. *Parasit Vectors*. 2019;12(1):103.

5. Basile K, McPhie K, Carter I, et al. Cell-based culture of SARS-CoV-2 informs infectivity and safe de-isolation assessments during COVID-19 [published online ahead of print 2020]. *Clin Infect Dis*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1579>.
6. Folgueira MD, Luczkowiak J, Lasala F, Pérez-Rivilla A, Delgado R. Prolonged SARS-CoV-2 cell culture replication in respiratory samples from patients with severe COVID-19 [published online ahead of print 2021]. *Clin Microbiol Infect*. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.02.014>.
7. van Kampen JJA, van de Vijver DAMC, Fraaij PLA, et al. Duration and key determinants of infectious virus shedding in hospitalized patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Nat Commun*. 2021;12(1):267.
8. Decker A, Welzel M, Laubner K, et al. Prolonged SARS-CoV-2 shedding and mild course of COVID-19 in a patient after recent heart transplantation. *Am J Transplant*. 2020;20(11):3239-3245.
9. Aydililo T, Gonzalez-Reiche AS, Aslam S, et al. Shedding of viable SARS-CoV-2 after immunosuppressive therapy for cancer. *N Engl J Med*. 2020;383:2586-2588.
10. CDC Healthcare Workers. Centers for disease control and prevention. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/index.html>. Accessed February, 19, 2021.
11. European Centre for Disease Prevention and Control. Guidance for discharge and ending of isolation of people with COVID-19. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/covid-19-guidance-discharge-and-ending-isolation>. Accessed February, 19, 2021.
12. Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations. *Virological*. <https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563>. Accessed February 15, 2021.
13. Choi B, Choudhary MC, Regan J, et al. Persistence and evolution of SARS-CoV-2 in an immunocompromised host. *N Engl J Med*. 2020;383(23):2291-2293.
14. Avanzato VA, Matson MJ, Seifert SN, et al. Case study: prolonged infectious SARS-CoV-2 shedding from an asymptomatic immunocompromised individual with cancer. *Cell*. 2020;183(7):1901-1912.
15. Singanayagam A, Patel M, Charlett A, et al. Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Eurosurveillance*. 2020;25(32):2001483.
16. Jaafar R, Aherfi S, Wurtz N, et al. Correlation between 3790 quantitative polymerase chain reaction-positives samples and positive cell cultures, including 1941 severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolates [published online ahead of print 2020]. *Clin Infect Dis*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1491>.

**How to cite this article:** Benotmane I, Risch S, Doderer-Lang C, Caillard S, Fafi-Kremer S. Long-term shedding of viable SARS-CoV-2 in kidney transplant recipients with COVID-19. *Am J Transplant*. 2021;21:2871-2875. <https://doi.org/10.1111/ajt.16636>

# Persistence of SARS-CoV-2 antibodies in kidney transplant recipients

## To the Editor:

Data on the long- and middle-term dynamics of antibody response to SARS-CoV-2 after COVID-19 in the immunocompromised population remain scanty while reports on a decrease in antibody titers in immunocompetent patients are controversial.<sup>1,2</sup> We have previously described the serological response against SARS-CoV-2 in 35 kidney transplant recipients (KTR) hospitalized for COVID-19 until 2 months after symptoms onset.<sup>3</sup> Here, antibody levels were prospectively measured in the same cohort for up to 6 months after symptom onset. Titers of IgM and IgG binding antibodies against SARS-CoV-2 recombinant nucleocapsid and spike antigens were quantified using a commercially available ELISA (DIA.PRO Diagnostic BioProbes Srl, Sesto San Giovanni, Italy).<sup>3</sup> Samples with a signal to cutoff ratio (S/CO)  $\geq 1.1$  were considered positive,  $\geq 0.9$  and  $< 1.1$  equivocal, and  $< 0.9$  negative. The study protocol was reviewed and approved by the local Institutional Review Board (approval number: DC-2013-1990).

All surviving patients ( $n = 29$ ) described in our previous study<sup>3</sup> (86% men; median age: 60.3 years; interquartile range [IQR]: 52.3–66.8 years; median body mass index: 28 kg/m<sup>2</sup> [IQR: 24–33 kg/m<sup>2</sup>]) were included in this follow-up. Eight patients had severe COVID-19 (oxygen requirement  $> 6$  L/min; need for intensive care unit admission; and/or death), whereas the remaining 21 had a non-severe disease. Overall, 194 samples were analyzed (median number of sera per patient: 7; IQR: 5.5–8). All sera tested as of day 13 (D13) were positive. IgM and IgG were detectable after a median of D17 and reached a peak at D37 (IQR: 23–48) and D38 (IQR: 30–50), respectively (Figure 1A,B). IgG peak levels were positively associated with viral load peaks in nasopharyngeal swabs (Spearman's  $\rho = 0.36$ ,  $p = .05$ ) and inversely correlated with the duration of positive RNA testing for SARS-CoV-2 ( $\rho = -0.46$ ,  $p = .001$ ). The median percentage decline for IgM and IgG was 83% (IQR: 70–91%) and 68% (IQR: 32%–83%), respectively. Between D145 and D190, the vast majority of patients ( $n = 21$ , 72.4%) remained seropositive, two had equivocal IgG results in the absence of IgM, and only six (20.7%) were found to be seronegative. Patients treated with calcineurin inhibitors and steroids showed a more pronounced IgG reduction (Table 1), which was inversely correlated with the IgG peak ( $\rho = -0.46$ ,  $p = .001$ ). IgG peak levels and kinetics did not differ significantly according to COVID-19 severity (Table 1).

To our knowledge, this is the first study to describe the 6-month evolution of SARS-CoV-2 antibodies in an immunocompromised population. While 20.7% of the study patients became seronegative, 72.4% were found to display anti-SARS-CoV-2 antibodies up to 6 months after COVID-19. Despite a prolonged period of viral shedding in KTR,<sup>4</sup> the antibody kinetics were close to those observed in immunocompetent subjects—with an antibody peak titer reached at approximately D40. An initial decline in antibody titers does not necessarily imply their disappearance. Accordingly, low antibody levels may persist for several years, as it was previously observed for SARS-CoV.<sup>2</sup> Moreover, disappearance of binding antibodies is not invariably correlated with neutralizing antibodies, B-cell memory, and T-cell response.<sup>2</sup> A recent study reported a reduction of antibody titers in two KTR without a corresponding decline in T-cell response 2 months after COVID-19,<sup>5</sup> but these results require confirmation by following a larger cohort for a longer period of time. In conclusion, our findings indicate that SARS-CoV-2 antibodies are present in the majority of KTR at 6 months after COVID-19. The presence of antibodies against SARS-CoV-2 in KTR should be viewed as encouraging with respect to the possibility of eliciting of an immune response to vaccination in this clinical population. However, the question as to whether the 20% of patients who lost their antibodies may be at risk of being re-infected remains unanswered.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Strasbourg University Hospital (COVID-HUS study-HUS No. 7760).

## KEYWORDS

antibody biology, biomarker, clinical research/practice, immune deficiency, infection and infectious agents – viral, infectious disease, kidney transplantation/nephrology

## FUNDING INFORMATION

Strasbourg University Hospital, Grant/Award Number: 7760

## DISCLOSURE

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*.

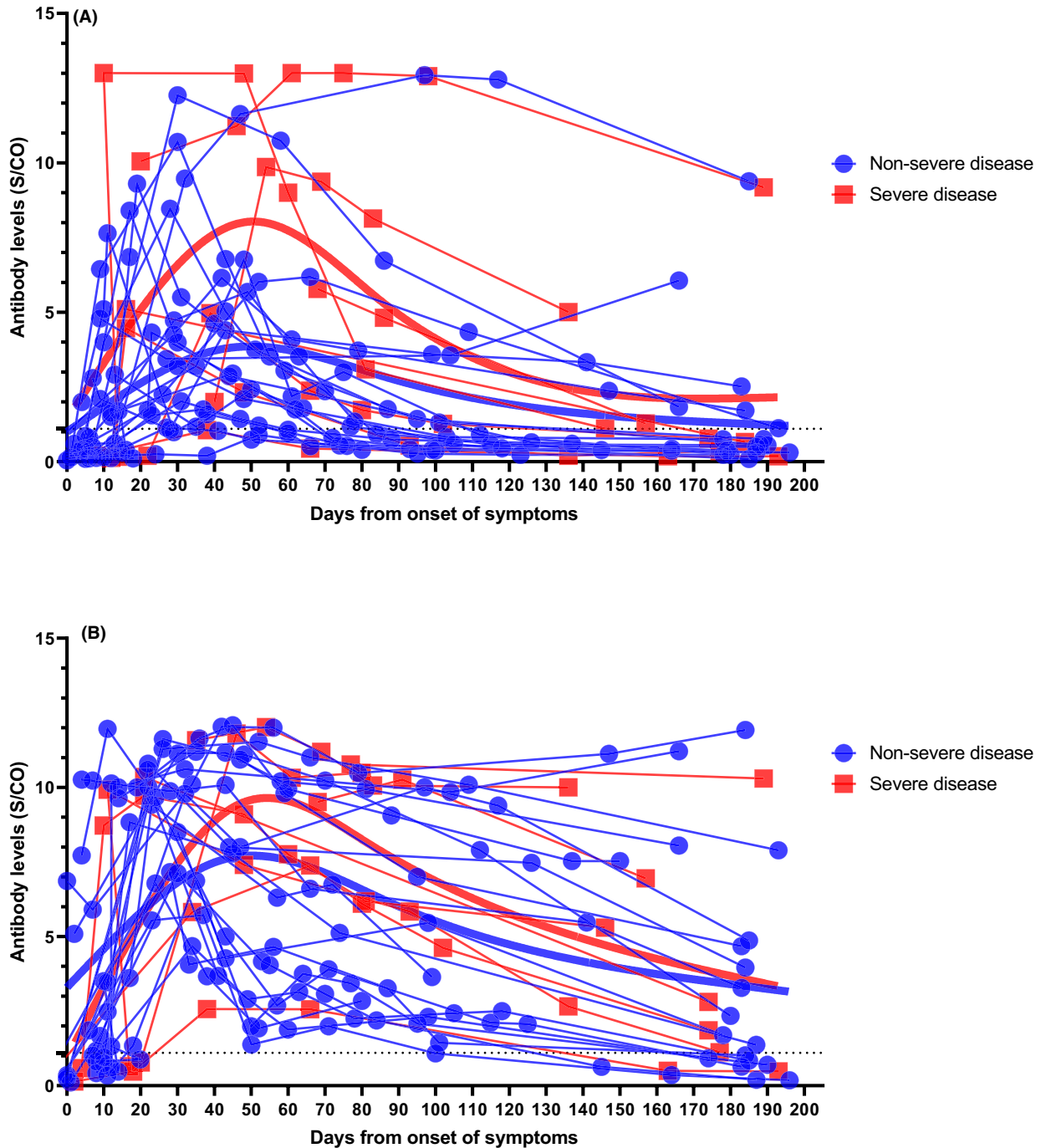






FIGURE 1 SARS-CoV-2 IgM and IgG titers kinetics tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). IgM (A) and IgG (B) titers kinetics from the day of symptom onset (B). Each patient's ( $n = 29$ ) kinetic is presented in relation to COVID-19 severity (non-severe disease: blue; severe disease: red). The thick lines indicate the trend in viral load using smoothing splines. Antibody levels are presented as the measured signal to cutoff ratio (S/CO). The dotted line represents the threshold value (1.1) for seropositivity [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

Ilies Benotmane<sup>1,2,3</sup>   
 Gabriela Gautier Vargas<sup>1</sup>   
 Aurélie Velay<sup>2,3</sup>  
 Marie-José Wendling<sup>3</sup>  
 Peggy Perrin<sup>1,2</sup>  
 Samira Fafi-Kremer<sup>2,3</sup>   
 Sophie Caillard<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>Department of Nephrology and Transplantation, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

<sup>2</sup>INSERM U1109, LabEx TRANSPLANTECH, Strasbourg, France

Email: [sophie.caillard@chru-strasbourg.fr](mailto:sophie.caillard@chru-strasbourg.fr)

<sup>3</sup>Department of Virology, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France



TABLE 1 Anti-SARS-CoV-2 IgG peak levels and anti-SARS-CoV-2 IgG decrease rates according to demographic and clinical characteristics of hospitalized kidney transplant recipients with COVID-19 (n = 29)

	N	IgG peak level	p	IgG decrease rate	p
Disease severity <sup>a</sup>					
Non-severe patient	21	10.0 [5.7–11.2]	.66	68% [34–84]	.56
Severe patient	8	10.0 [7.4–10.5]		59% [28–77]	
Age, years					
<60	14	8.4 [6.0–10.9]	.63	71% [61–84]	.09
≥60	15	10.3 [9.3–11.2]		45% [18–80]	
Sex					
Female	4	8.7 [6.3–10.3]	.45	84% [69–86]	.27
Male	25	10.3 [6.9–11.2]		63% [32–78]	
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>					
<30	16	10.0 [7.3–11.3]	.61	64% [33–80]	.79
≥30	13	10.3 [5.5–10.8]		69% [32–83]	
Cardiovascular comorbidity					
No	18	10.3 [5.5–11.5]	.98	71% [31–80]	.91
Yes	11	10 [9.1–10.8]		61% [36–84]	
Respiratory disease					
No	22	9.9 [6.1–10.7]	.23	73% [61–84]	.01
Yes	7	11.1 [8.8–11.8]		23% [9–23]	
Diabetes					
No	18	10 [7.4–12]	.82	64% [32–82]	.43
Yes	11	10.3 [5–11]		73% [38–88]	
HBP					
No	7	10 [7.1–11.1]	.85	68% [42–88]	.63
Yes	22	10.1 [5.9–12.1]		66% [31–80]	
Immunosuppressive induction therapy					
Anti-thymocyte globulin	14	9.1 [6–12]	.6	65% [32–85]	.75
Anti-CD25	12	10.6 [8.5–11.4]		79% [35–79]	
No induction	3	10 [8.7–10.6]		51% [40–73]	
Immunosuppressive maintenance therapy					
CNI					
No	4	9.7 [8–10.3]	.66	37% [17–54]	.05
Yes	25	10.3 [6.9–11.2]		73% [34–84]	
MMF/MPA					
No	4	10.1 [9.4–10.4]	1	69% [55–79]	.68
Yes	25	10 [5.7–11.2]		68% [31–83]	
mTORi					
No	24	10 [5.7–11.3]	.75	68% [32–83]	.84
Yes	5	10 [10–10.8]		63% [51–75]	
Steroids					
No	14	10.6 [9.1–12.1]	.22	48% [24–74]	.06
Yes	15	9.4 [5.6–12]		73% [62–88]	
Clinical symptoms					
Dyspnea					
No	12	11.4 [6.6–11.4]	.48	69% [32–82]	1
Yes	17	10 [7.4–10.8]		64% [35–82]	

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

	N	IgG peak level	p	IgG decrease rate	p
Cough					
No	8	6.6 [5–9.3]	.08	69% [34–83]	.72
Yes	21	10.3 [9.4–11.2]		64% [31–82]	
Diarrhea					
No	5	9.4 [7.4–9.7]	.22	61% [38–74]	.43
Yes	24	10.3 [6.6–11.3]		71% [32–85]	

IgG peak is presented as the signal to cutoff ratio (S/CO) and is expressed as median (interquartile range). IgG decrease is summarized as the median percentage decline (interquartile range).

Abbreviations: CNI, calcineurin inhibitors; HBP, high blood pressure; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid, mTORi, mammalian target of rapamycin inhibitors.

<sup>a</sup>Oxygen requirement >6 L/min; need for intensive care unit admission; and/or death.

Sophie Caillard and Samira Fafi-Kremer contributed equally to this work.

#### ORCID

Ilies Benotmane  <https://orcid.org/0000-0001-9113-2479>

Gabriela Gautier Vargas  <https://orcid.org/0000-0001-9377-1055>

Samira Fafi-Kremer  <https://orcid.org/0000-0003-3886-7833>

Sophie Caillard  <https://orcid.org/0000-0002-0525-4291>

#### REFERENCES

1. Yang OO, Ibarondo FJ. Loss of anti-SARS-CoV-2 antibodies in mild Covid-19. Reply. *N Engl J Med*. 2020;383(17):1697-1698.
2. Baumgarth N, Nikolich-Zugich J, Lee FE-H, Bhattacharya D. Antibody responses to SARS-CoV-2: let's stick to known knowns. *J Immunol*. 2020;205(9):2342-2350.
3. Benotmane I, Gautier-Vargas G, Wendling M-J, et al. In-depth virological assessment of kidney transplant recipients with COVID-19. *Am J Transplant*. 2020;20(11):3162-3172.
4. Caillard S, Benotmane I, Vargas GG, Perrin P, Fafi-Kremer S. SARS-CoV-2 viral dynamics in immunocompromised patients. *Am J Transplant*. 2020. <https://doi.org/10.1111/ajt.16353>.
5. Candon S, Guerrot D, Drouot L, et al. T cell and antibody responses to SARS-CoV-2: experience from a French transplantation and hemodialysis center during the COVID-19 pandemic. *Am J Transplant*. 2020; <https://doi.org/10.1111/ajt.16348>.



## **V. Évaluation de la réponse vaccinale anti-SARS-CoV-2 chez les transplantés rénaux**

### **A. Réponse vaccinale après deux ou trois doses de vaccins et analyse détaillée des facteurs prédictifs de cette réponse**

#### *1) Rationnel et objectifs de l'étude*

Comme nous venons de le voir, les patients ayant bénéficié d'une transplantation rénale ont un risque plus élevé de complications liées au COVID-19 avec des incidences accrues d'hospitalisation et de mortalité. Devant ce constat, les patients transplantés ont bénéficié d'un accès prioritaire à la vaccination en France et en Europe notamment.<sup>281,631</sup> Malheureusement, ces patients immunodéprimés n'ont pas été inclus dans les essais cliniques d'efficacité des vaccins anti-SARS-CoV-2. Il était donc difficile d'anticiper la réponse vaccinale, d'autant plus que les premiers vaccins disponibles utilisaient des technologies qui n'étaient pas encore évaluées chez les patients immunodéprimés (vaccins à ARNm et vaccins à vecteur viral). Les données préliminaires publiées par de multiples équipes dont notre équipe avaient montré une faible réponse humorale après deux doses de vaccins (annexes).<sup>632,633</sup> Ce constat a conduit les autorités sanitaires à autoriser une dose supplémentaire de vaccin.<sup>634</sup> Cette dernière a permis d'améliorer la réponse vaccinale mais certains patients restaient toujours non-répondeurs (annexes).<sup>635,636</sup> Il est important de noter que les transplantés présentaient des variations interindividuelles marquées dans l'ampleur et l'occurrence des réponses immunitaires aux vaccins, certains étant capables d'obtenir une protection humorale et à médiation cellulaire acceptables après deux doses, et d'autres étant incapables d'obtenir une réponse adéquate même après trois doses. Le but de cette vaste étude observationnelle monocentrique était d'identifier les facteurs prédictifs de la réponse sérologique au vaccin Spikevax (Moderna) chez les transplantés rénaux. Nous avons également conçu un score pour optimiser la prédiction de la réponse vaccinale et développé une stratégie de vaccination personnalisée basée sur la réponse humorale initiale.

## 2) Principaux points de méthodologies

La population étudiée était constituée de transplantés rénaux suivis dans le service de transplantation rénale du CHU de Strasbourg. Les patients inclus avaient reçu au moins deux doses du vaccin Spikevax entre le 16 février 2021 et le 22 avril 2021. Les critères d'exclusion étaient les suivants : des données de suivi incomplètes, y compris une sérologie SARS-CoV-2 manquante après la deuxième dose ; un antécédent de COVID-19 avant la première dose ; et une sérologie pré-vaccinale anti-SARS-CoV-2 positive. La survenue et la sévérité du COVID-19 symptomatique après la vaccination ont été rapportées.

La réponse vaccinale a été mesurée par une sérologie (ARCHITECT IgG II Quant test, Abbott, Abbott Park, IL, USA ; plage de détection : 6,8–80 000 AU/mL ; concordance positive : 99,4 % ; concordance négative : 99,6 %). Les titres ont ensuite été convertis selon la norme de l'OMS et exprimés en BAU/mL. Les résultats de ce test sont corrélés avec la neutralisation *in vitro* de la souche ancestrale du SARS-CoV-2. Selon les instructions du fabricant, les patients avec des titres  $\geq 7,1$  BAU/mL étaient considérés comme séropositifs. Parmi eux, ceux qui avaient des titres  $< 143$  BAU/mL étaient considérés comme des répondeurs modérés et ceux avec des titres  $\geq 143$  BAU/mL étaient classés comme bons répondeurs. Ce seuil est corrélé à une efficacité vaccinale  $> 70$  % et à la présence d'anticorps neutralisants contre les souches de SARS-CoV-2 dominante avant l'ère delta.<sup>637,638</sup> Les patients avec un titre  $< 7,1$  BAU/mL étaient considérés comme séronégatifs. Dans ce dernier groupe, ceux qui avaient des titres  $< 1$  BAU/mL étaient considérés comme non-répondeurs ; à l'inverse, ceux dont les titres étaient compris entre 1 et 7,1 BAU/mL ont été classés comme répondeurs faibles. Les titres d'IgG anti-RBD ont été mesurés : (1) avant la première dose de vaccin, (2) un mois après chaque dose de vaccin et (3) trois et six mois après la dernière dose de vaccin. Dans un contexte de disponibilité limitée de vaccins durant la période d'étude, seuls les patients qui présentaient un titre d'anticorps inférieur à 143 BAU/mL après la deuxième dose de vaccin (c'est-à-dire ceux classés comme non

répondeurs, faibles et modérés) étaient éligibles pour recevoir une troisième dose selon le schéma vaccinal initial.

### 3) *Principaux résultats*

#### (a) **Caractéristiques des patients et réponse sérologique après la première dose de vaccin**

Nous avons initialement identifié 734 patients qui avaient reçu au moins une dose de vaccin Spikevax. Après exclusion des patients ayant des antécédents de COVID-19 ou une séropositivité SARS-CoV-2 (n = 45) et ceux avec des données de suivi sérologiques incomplètes (n = 123), 566 transplantés ont été inclus (figure 44). Deux patients ont développé un COVID-19 symptomatique respectivement à J17 et J24 après la première dose de vaccin et deux autres ont développé le COVID-19 après la deuxième dose mais avant le bilan sérologique. Les 562 patients restants (âge moyen :  $56,7 \pm 13,1$  ans) étaient majoritairement des hommes (61,2 %). Le délai de la transplantation était en moyenne de  $9,4 \pm 6,4$  ans. Une triple immunosuppression avec une combinaison de tacrolimus, de MMF/MPA et de stéroïdes était administrée à 34,5 % des participants.

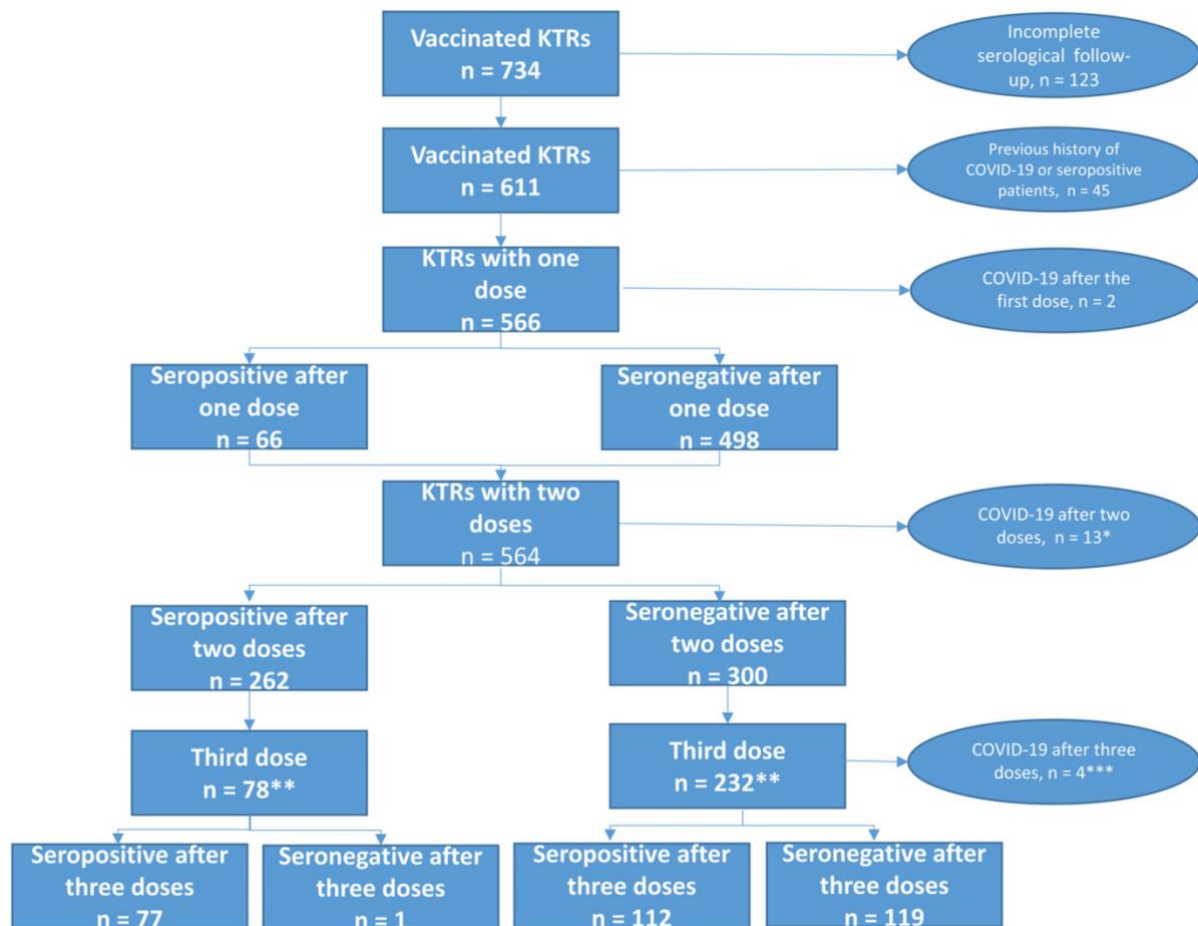


Figure 44. Diagramme de flux.

\* Parmi les 13 patients qui ont développé le COVID-19 après la deuxième dose de vaccin, un a présenté une réponse modérée (titre d'anticorps : 99 BAU/mL), quatre étaient des répondeurs faibles et six des non-répondeurs. Deux transplantés ont été diagnostiqués avec un COVID-19 avant l'évaluation sérologique dans un délai d'un mois et n'ont pas été inclus dans l'analyse.

\*\* Uniquement les patients avec une sérologie disponible après la troisième dose de vaccin.

\*\*\* Parmi les quatre patients atteints de COVID-19, deux ont présenté une réponse modérée et un était non-répondeur un mois après la troisième dose. Le quatrième patient a développé le COVID-19 dans le mois qui a suivi l'administration du vaccin ; cependant, la sérologie n'était pas disponible.

### (b) Réponse sérologique après la deuxième dose de vaccin

Un mois après la deuxième dose de vaccin, le taux de séropositivité était de 46,6 % (n = 262) ; mais seulement 125 patients (22,2 %) ont été classés comme bons répondeurs (figure 45). Les titres moyens d'anticorps ont augmenté de manière significative de  $20,7 \pm 218,9$  BAU/mL à  $296,7 \pm 1011$  BAU/mL après la deuxième dose ( $p < 0,0001$ ). Les titres étaient significativement

plus élevés chez les patients qui avaient déjà atteint la séropositivité après la première dose par rapport à ceux qui n'y étaient pas parvenus ( $1939 \pm 2265,3$  BAU/mL contre  $79,6 \pm 268,7$  BAU/mL, respectivement,  $p < 0,0001$ ).

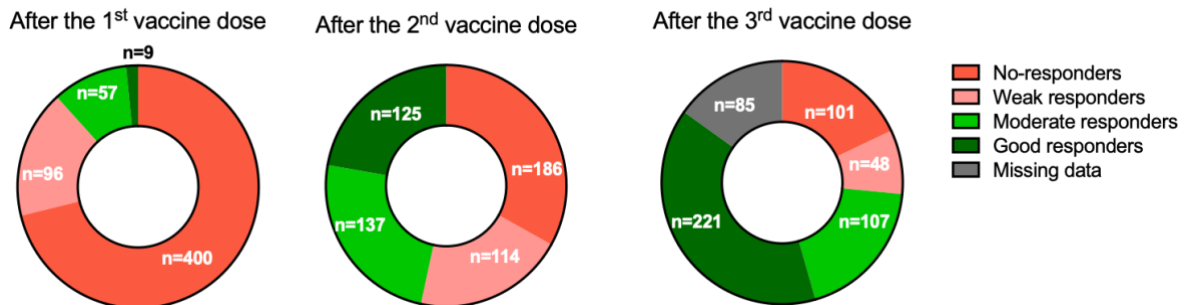


Figure 45. Répartition des 562 transplantés rénaux selon la réponse sérologique évaluée un mois après les première, deuxième et troisième doses de vaccin.

Les patients qui présentaient des titres  $< 1$  BAU/mL ont été considérés comme non-répondeurs. À l'inverse, ceux dont les titres étaient compris entre 1 et 7,1 BAU/mL ont été classés comme répondeurs faibles. Les patients avec des titres entre 7,1 et 143 BAU/mL ont été considérés comme des répondeurs modérés ; et ceux avec des titres  $\geq 143$  BAU/mL ont été classés comme bons répondeurs.

L'analyse multivariée (figure 46) a identifié les variables suivantes comme étant indépendamment associées à la séroconversion après la deuxième dose : traitement par MMF/MPA (Odds ratio [OR] = 0,29, [IC95 % : 0,15–0,56] ;  $p = 0,0002$ ), traitement par tacrolimus (OR = 0,54, [IC95 % : 0,35–0,83] ;  $p = 0,005$ ), traitement par bélatcept (OR = 0,18, [IC95 % : 0,04–0,86] ;  $p = 0,03$ ), traitement par stéroïdes (OR = 0,58, [IC95 % : 0,38–0,88] ;  $p = 0,01$ ), créatinine (pour chaque augmentation de 100  $\mu\text{mol/L}$  : OR = 0,37, [IC95 % : 0,25–0,55] ;  $p = 0,0001$ ), délai depuis la transplantation (pour chaque diminution sur 10 ans : OR = 0,57, [IC95 % : 0,42–0,77] ;  $p = 0,0002$ ) et l'âge (pour chaque augmentation sur 10 ans : OR = 0,82, [IC95 % : 0,69–0,97] ;  $p = 0,02$ ).

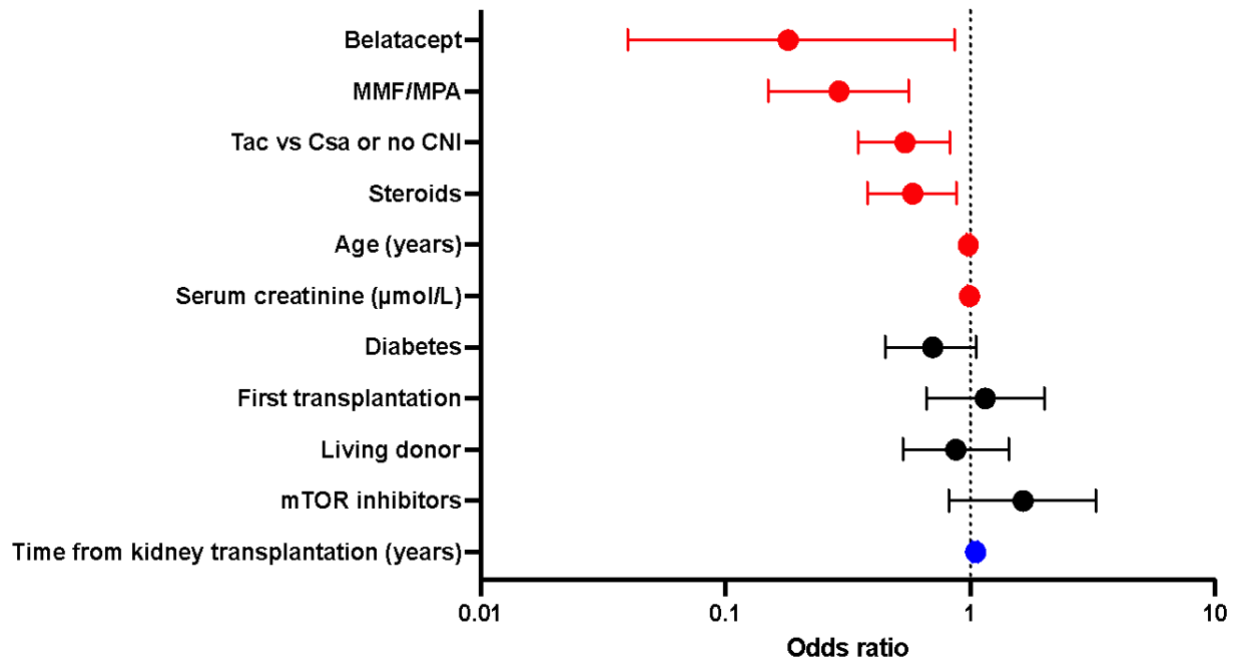


Figure 46. Analyse multivariée des facteurs prédictifs de la séroconversion après deux doses de vaccin.

L'odds ratio et son intervalle de confiance à 95% sont représentés pour chaque paramètre.

Nous avons aussi constaté que les concentrations résiduelles de tacrolimus et de ciclosporine, ainsi que les doses de MMF/MPA, étaient plus faibles chez les patients ayant atteint la séroconversion (figure 47).

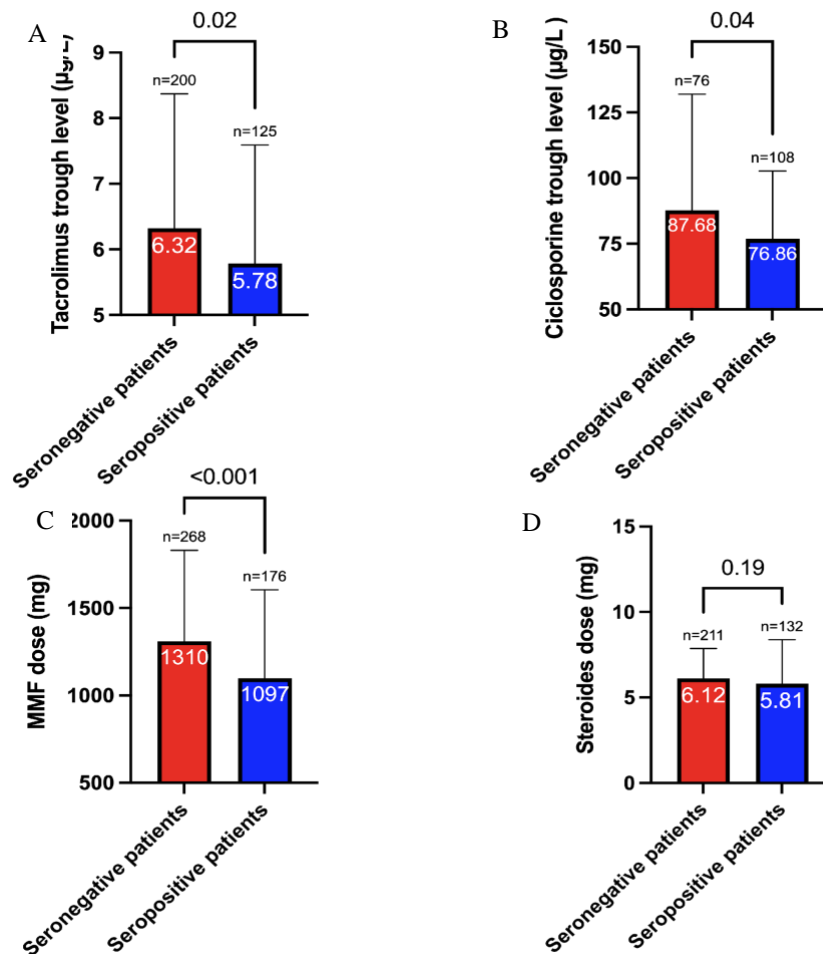


Figure 47. Impact des doses et concentrations résiduelles d’immunosuppresseurs sur la séroconversion après la seconde dose de vaccin.

Concentration résiduelle de tacrolimus (A), concentration résiduelle de ciclosporine (B), dose de mycophénolate mofétil (MMF) (C) et dose de stéroïdes (D) selon le statut sérologique après la deuxième dose de vaccin. Les moyennes sont marquées en blanc pour chaque colonne ; le nombre de patients et les valeurs de p (test du  $\chi^2$ ) sont également rapportés.

Les variables associées à la réponse vaccinale ont été utilisées pour concevoir un score empirique de prédiction de la séroconversion (tableau IV). Le score final a montré une forte association avec la séropositivité (AUC de la courbe ROC = 0,752,  $p < 0,0001$ ) et une bonne réponse à la vaccination (AUC de la courbe ROC = 0,785,  $p < 0,0001$ ). Les patients avec un score de 15 ou plus étaient séronégatifs dans 76 % des cas.

Tableau IV. Variables incluses dans le score de prédiction de la réponse sérologique à la vaccination.

Variable	Coefficient
<b>Bélatacept</b>	5,6
<b>Tacrolimus</b>	1,9
<b>MMF/MPA</b>	3,4
<b>Steroides</b>	1,7
<b>Créatinémie (pour chaque 100 <math>\mu\text{mol/L}</math> supplémentaire)</b>	2,7
<b>Age (par 10 ans)</b>	1,2
<b>Délai depuis la transplantation (par 10 ans)</b>	-1,75

Abbreviations: MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid.

### (c) Réponse sérologique après la troisième dose de vaccin

Sur les 562 transplantés rénaux inclus dans l'étude, 349 ont reçu une troisième dose de vaccin. Les données sérologiques étaient disponibles pour 309 patients (figure 44). Avant la troisième dose, 140 (45,3 %) transplantés étaient classés comme non-répondeurs, 90 (29,1 %) comme faiblement répondeurs, 73 (23,6 %) comme modérément répondeurs et 5 (1,6 %) comme bons répondeurs. Après la troisième dose, le taux de séropositivité est passé de 25,2 % à 61,2 % (de 78 à 189 patients) dont 101 patients (32,7 %) ont été classés comme bons répondeurs (figure 45). Les titres moyens d'anticorps ont augmenté de manière significative de  $142 \pm 637$  BAU/mL à  $598 \pm 864$  BAU/mL ( $p < 0,0001$ ). L'analyse multivariée (figure 48) a identifié les variables suivantes comme indépendamment associées à une plus faible probabilité de séroconversion après la troisième dose : traitement par tacrolimus (OR = 0,44, [IC95 % : 0,22–0,85] ;  $p = 0,02$ ), traitement par bélatacept (OR = 0,03, [IC95 % : 0,003–0,32] ;  $p = 0,003$ ), traitement par stéroïdes (OR = 0,4, [IC95 % : 0,21–0,77] ;  $p = 0,006$ ), créatinine (pour chaque augmentation de 100  $\mu\text{mol/L}$  : OR = 0,42, [IC95 % : 0,23–0,72] ;  $p = 0,002$ ), le temps écoulé depuis la transplantation (pour chaque diminution sur 10 ans : OR = 0,38, [IC95 % : 0,23–0,62] ;  $p = 0,0002$ ) et l'âge (pour chaque période de 10 ans augmentation : OR = 0,62, [IC95 % : 0,47–0,81] ;  $p = 0,0004$ ). Inversement, un indice de masse corporelle plus élevé (pour chaque



1 m/kg<sup>2</sup> : OR = 1,06, [IC95 % : 1,01–1,12] ; p = 0,01) et le sexe masculin (OR = 3,07, [IC95 % : 1,7–5,5] ; p = 0,0002) étaient associés à une probabilité plus élevée de séroconversion.

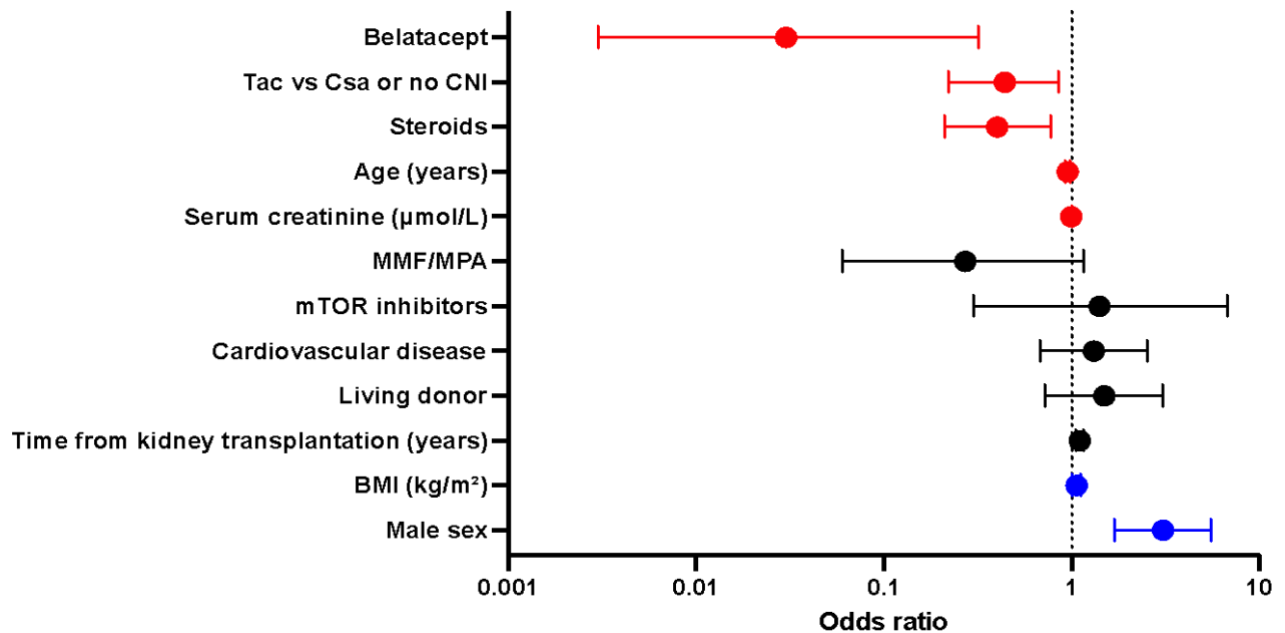


Figure 48. Analyse multivariée des facteurs prédictifs de la séroconversion après trois doses de vaccin.

L'odds ratio et son intervalle de confiance à 95% sont représentés pour chaque paramètre.

Ni les doses ni les concentrations minimales de médicaments immunosuppresseurs n'étaient associées à la réponse sérologique.

#### (d) Réponse globale dans l'ensemble de la cohorte

Sur les 477 patients qui avaient des données sérologiques après la dernière dose de vaccin, le taux de séropositivité était de 69 % (n = 328) ; parmi eux, 221 (46,3 %) étaient de bons répondeurs.

**(e) Cinétique des anticorps à six mois après la deuxième dose de vaccin**

La cinétique des anticorps anti-RBD a été évaluée chez 100 patients après un intervalle moyen de  $97 \pm 15$  jours à compter de la deuxième dose de vaccin (M3). De M1 à M3, les titres moyens d'anticorps ont diminué de manière significative de  $992,8 \pm 1546$  BAU/mL à  $499,7 \pm 788,6$  BAU/mL ( $p < 0,0001$ ). Chez 38 patients, les titres moyens des anticorps ont aussi été évalués après un intervalle moyen de  $183,6 \pm 16,4$  jours à compter de la deuxième dose de vaccin (M6). De M3 à M6, les titres moyens d'anticorps ont baissé de manière significative de  $754,6 \pm 673,3$  BAU/mL à  $263,1 \pm 598,1$  BAU/mL ( $p = 0,01$ ).



**(f) Cinétique des anticorps à trois mois après la troisième dose de vaccin**

La cinétique des anticorps anti-RBD a été évaluée chez 136 transplantés rénaux après un intervalle moyen de  $109 \pm 18$  jours à partir de la troisième dose de vaccin (M3). De M1 à M3, les titres moyens d'anticorps ont diminué de manière significative de  $401,7 \pm 860,2$  BAU/mL à  $296,1 \pm 588$  BAU/mL ( $p = 0,01$ ).

La méthodologie, les résultats et la discussion détaillés du manuscrit concernant ces résultats sont présentés ci-dessous.

Article

# Prediction of Vaccine Response and Development of a Personalized Anti-SARS-CoV-2 Vaccination Strategy in Kidney Transplant Recipients: Results from a Large Single-Center Study

Ilies Benotmane <sup>1,2,\*</sup> , Gabriela Gautier-Vargas <sup>1</sup>, Noëlle Cognard <sup>1</sup>, Jérôme Olgne <sup>1,2</sup>, Françoise Heibel <sup>1</sup>, Laura Braun-Parvez <sup>1</sup>, Jonas Martzloff <sup>1</sup>, Peggy Perrin <sup>1,2</sup> , Romain Pszczolinski <sup>1</sup>, Bruno Moulin <sup>1,2</sup>, Samira Fafi-Kremer <sup>2,3</sup> and Sophie Caillard <sup>1,2</sup>

- <sup>1</sup> Department of Nephrology, Dialysis and Transplantation, Strasbourg University Hospital, 1 Place de l'Hopital, BP 426, 67091 Strasbourg, France; gabriela.gautier-vargas@chru-strasbourg.fr (G.G.-V.); noelle.cognard@chru-strasbourg.fr (N.C.); jerome.olagne@chru-strasbourg.fr (J.O.); francoise.heibel@chru-strasbourg.fr (F.H.); laura.braun-parvez@chru-strasbourg.fr (L.B.-P.); jonas.martzloff@chru-strasbourg.fr (J.M.); peggy.perrin@chru-strasbourg.fr (P.P.); romain.pszczolinski@chru-strasbourg.fr (R.P.); bruno.moulin@chru-strasbourg.fr (B.M.); sophie.caillard@chru-strasbourg.fr (S.C.)
- <sup>2</sup> Fédération de Médecine Translationnelle (FMTS), 67000 Strasbourg, France; samira.fafi-kremer@unistra.fr
- <sup>3</sup> Department of Virology, Strasbourg University Hospital, BP 426, 67091 Strasbourg, France
- \* Correspondence: ilies.benotmane@chru-strasbourg.fr



**Citation:** Benotmane, I.; Gautier-Vargas, G.; Cognard, N.; Olgne, J.; Heibel, F.; Braun-Parvez, L.; Martzloff, J.; Perrin, P.; Pszczolinski, R.; Moulin, B.; et al. Prediction of Vaccine Response and Development of a Personalized Anti-SARS-CoV-2 Vaccination Strategy in Kidney Transplant Recipients: Results from a Large Single-Center Study. *J. Pers. Med.* **2022**, *12*, 1107. <https://doi.org/10.3390/jpm12071107>

Academic Editor: Roger E. Thomas

Received: 5 May 2022

Accepted: 4 July 2022

Published: 5 July 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Kidney transplant recipients (KTRs) displays marked inter-individual variations in magnitude of immune responses to anti-SARS-CoV-2 vaccination. The aim of this large single-center study was to identify the predictive factors for serological response to the mRNA-1273 vaccine in KTRs. We also devised a score to optimize prediction with the goal of implementing a personalized vaccination strategy. The study population consisted of 564 KTRs who received at least two doses of the mRNA-1273 vaccine. Anti-RBD IgG titers were quantified one month after each vaccine dose and until six months thereafter. A third dose vaccine was given when the antibody titer after the second dose was <143 BAU/mL. A score to optimize prediction of vaccine response was devised using the independent predictors identified in multivariate analysis. The seropositivity rate after the second dose was 46.6% and 22.2% of participants were classified as good responders (titers  $\geq$  143 BAU/mL). On analyzing the 477 patients for whom serology testing was available after the second or third dose, the global seropositivity rate was 69% (good responders: 46.3%). Immunosuppressive drugs, graft function, age, interval from transplantation, body mass index, and sex were associated with vaccine response. The devised score was strongly associated with the seropositivity rate (AUC = 0.752,  $p < 0.0001$ ) and the occurrence of a good antibody response (AUC = 0.785,  $p < 0.0001$ ). Notably, antibody titers declined over time both after the second and third vaccine doses. In summary, a high burden of comorbidities and immunosuppression was correlated with a weaker antibody response. A fourth vaccine dose and/or pre-exposure prophylaxis with monoclonal antibodies should be considered for KTRs who remain unprotected.

**Keywords:** kidney transplant recipients; COVID-19; anti-SARS-CoV-2 mRNA vaccine; serological response; prediction

## 1. Introduction

A history of kidney transplantation confers a higher risk of COVID-19-related complications and poor outcomes, including hospitalization, intensive care unit admission, and mortality [1,2]. While kidney transplant recipients (KTRs) have been prioritized for anti-SARS-CoV-2 vaccination, immunocompromised patients were not included in pivotal

efficacy trials of mRNA-based COVID-19 vaccines [3]. In addition, primary vaccination campaigns in KTRs were started with limited experimental data on their efficacy and potential complications on immunocompromised hosts. Several studies have shown that the magnitude of antibody response after COVID-19 vaccination may be limited in KTRs [4–7] and severe SARS-CoV-2 infections have been reported in vaccinated KTRs [8]. While a third dose of an mRNA vaccine may be useful in inducing a boost in immune response, some patients are still unable to achieve a sufficient protection. Importantly, KTRs display marked inter-individual variations in the magnitude and occurrence of immune responses to mRNA-based vaccines, with some being able to obtain acceptable humoral and cell-mediated protection after two doses and others unable to achieve adequate responsiveness even after three doses [9–11]. The aim of this large single-center observational study was to identify the predictive factors for serological response to the mRNA-1273 (Spikevax; Moderna) vaccine in KTRs. We also devised a score to optimize prediction of vaccine response and developed a personalized vaccination strategy based on the initial humoral response.

## 2. Patients and Methods

### 2.1. Study Population

The study population consisted of KTRs followed on an outpatient basis in the Department of Kidney Transplantation of the Strasbourg University Hospital (France). All of the KTRs included in the current investigation had received at least two doses of the mRNA-1273 vaccine between 16 February 2021 and 22 April 2021. Exclusion criteria were as follows: incomplete follow-up data, including missing SARS-CoV-2 serology after the second dose; a history of COVID-19 before the first dose; and a positive anti-SARS-CoV-2 pre-vaccination serology. Clinical and laboratory data were retrieved from digitalized medical records and the following variables were collected: patient characteristics, presence of comorbidities, transplantation-related data, and immunosuppressive drugs (including trough levels and dosages). The occurrence and severity of symptomatic COVID-19 after vaccination were carefully recorded. The study was registered at Clinicaltrials.gov (registration number: NCT04828460) and received ethical approval from the local Institutional Review Board (approval number: CE-2021-9).

### 2.2. Monitoring of Serological Response and Vaccination Strategy

Anti-Receptor Binding Domain (RBD) IgG titers were quantified using the ARCHITECT IgG II Quant test (Abbott, Abbott Park, IL, USA; detection range: 1–11,267 BAU/mL; positive agreement: 99.4%; negative agreement: 99.6%). Titers were subsequently converted according to the WHO standard and expressed in BAU/mL. The results of this assay correlate with the *in vitro* neutralization of ancestral SARS-CoV-2. According to the manufacturer's instructions, patients with titers  $\geq 7.1$  and  $< 7.1$  BAU/mL were considered as seropositive and seronegative, respectively. In the former group, those who harbored titers  $< 143$  BAU/mL were considered as moderate responders; conversely, those with titers  $\geq 143$  BAU/mL were classified as good responders. This threshold was found to correlate with the presence of neutralizing antibodies against ancestral strains and a vaccine efficacy  $> 70\%$  [12]. In the latter group, those who harbored titers  $< 1$  BAU/mL were considered as non-responders; conversely, those with titers between 1 and 7.1 BAU/mL were classified as weak responders. Anti-RBD IgG titers were measured at the following time points: (1) prior to the first vaccine dose, (2) one month after each vaccine dose, and (3) three and six months after the last vaccine dose. Patients who showed an antibody titer below 143 BAU/mL after the second vaccine dose (i.e., those classified as non-, weak, and moderate responders) were eligible to receive a third dose according to the initial vaccine scheme.

### 2.3. Statistical Analysis

Continuous data are summarized as means and standard deviations and their distribution was analyzed using the unpaired and paired Student's *t*-tests, as appropriate. Categorical variables are expressed as counts and percentages and the  $\chi^2$  test was used for

comparison. Receiver operating characteristic (ROC) curves were generated to investigate the relationships between continuous variables and response to vaccination. To identify the independent predictors of antibody response after the second and third vaccine doses, univariate and multivariate logistic regression models were constructed. Factors associated with response to the second vaccine dose were used to devise an empirical scale for the prediction of serological response (including both seropositivity and good response). The coefficient for each variable was inversed (1 divided by odds ratio [OR]), with the final score calculated as the sum of coefficients for each parameter. Data were analyzed using GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), with a significance level set at  $p < 0.05$  (two-tailed).

### 3. Results

#### 3.1. Patients Characteristics and Serological Response after the First Vaccine Dose

We initially identified a total of 734 KTRs who had received at least one mRNA-1273 vaccine dose. After exclusion of patients with a previous history of COVID-19 or SARS-CoV-2 seropositivity ( $n = 45$ ) and those with incomplete serological follow-up data ( $n = 123$ ), the study sample consisted of 566 KTRs (Figure 1). Two patients developed symptomatic COVID-19 at day 17 (D17) and D24 after the first vaccine dose, respectively and two others developed COVID-19 after the second dose but before the serological assessment. The remaining 562 patients (mean age:  $56.7 \pm 13.1$  years) were predominantly men (61.2%). The mean time elapsed from transplantation was  $9.4 \pm 6.4$  years. Triple-drug immunosuppression with a combination of tacrolimus, mycophenolate mofetil (MMF)/mycophenolic acid (MPA), and steroids was being administered to 34.5% of participants. The general characteristics of the study patients are summarized in Table 1. One month after the first vaccine dose, the mean antibody titer was  $20.7 \pm 218.9$  BAU/mL. The observed rate of SARS-CoV-2 seropositivity was as low as 11.7% ( $n = 66/562$ , Figure 2).

**Table 1.** Patient characteristics according to the absence or presence of seroconversion after two vaccine doses.

	Entire Cohort ( $n = 562$ )	SARS-CoV-2 Seronegative Patients ( $n = 300$ )	SARS-CoV-2 Seropositive Patients ( $n = 262$ )	$p$
Age (years)	56.7 ( $\pm 13.1$ )	57.3 ( $\pm 13$ )	56 ( $\pm 12.3$ )	0.25
Male sex	344 (61.2%)	180 (60%)	164 (62.6%)	0.53
Comorbidities				
BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	26.6 ( $\pm 5.7$ )	26.7 ( $\pm 5.8$ )	26.6 ( $\pm 5.5$ )	0.86
Cardiovascular disease	148 (26.34%)	80 (26.7%)	68 (26%)	0.85
Diabetes	204 (36.3%)	127 (42.3%)	77 (29.4%)	0.001
History of cancer	98 (17.4%)	57 (19%)	41 (15.7%)	0.3
Hypertension	472 (84%)	254 (84.7%)	218 (83.2%)	0.64
Time from kidney transplantation (years)	9.4 ( $\pm 6.4$ )	7.5 ( $\pm 6.9$ )	11.6 ( $\pm 8.6$ )	<0.0001
First transplantation	474 (84.3%)	243 (81%)	231 (88.2%)	0.02
Living donor	106 (18.9%)	63 (21%)	43 (16.4%)	0.17
CNI				<0.0001
Tacrolimus	328 (58.4%)	201 (67%)	127 (48.5%)	
Cyclosporine	184 (32.7%)	76 (25.3%)	108 (41.2%)	
No CNI	50 (8.9%)	23 (7.7%)	27 (10.3%)	
Tacrolimus dose (mg) *	5.4 ( $\pm 3.1$ )	5.8 ( $\pm 3.4$ )	4.8 ( $\pm 2.6$ )	0.03
Tacrolimus trough level ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ) **	6.1 ( $\pm 2$ )	6.3 ( $\pm 2.1$ )	5.8 ( $\pm 1.8$ )	0.02
Cyclosporine dose (mg)	151.1 ( $\pm 55.7$ )	155.8 ( $\pm 65.6$ )	147.8 ( $\pm 47.6$ )	0.33
Cyclosporine trough level ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	81.3 ( $\pm 35$ )	87.7 ( $\pm 44.3$ )	76.9 ( $\pm 25.9$ )	0.04
MMF/MPA	448 (79.7%)	269 (89.7%)	179 (68.3%)	<0.0001
MMF/MPA dose (mg) ***	1225 ( $\pm 525.3$ )	1310 ( $\pm 521.4$ )	1097 ( $\pm 506.3$ )	<0.0001
mTOR inhibitors	89 (15.8%)	27 (9%)	62 (23.6%)	<0.0001
mTOR inhibitors dose (mg) *	2.2 ( $\pm 1.1$ )	2.1 ( $\pm 0.9$ )	2.2 ( $\pm 1.1$ )	0.51
mTOR inhibitors trough level ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	5.2 ( $\pm 1.5$ )	5 ( $\pm 1.5$ )	5.3 ( $\pm 1.6$ )	0.38
Azathioprine	13 (2.3%)	0	13 (5%)	<0.0001
Belatacept	18 (3.2%)	16 (5.3%)	2 (0.8%)	0.002
Steroids	344 (61.2%)	212 (70.7%)	132 (50.4%)	<0.0001

Table 1. Cont.

	Entire Cohort (n = 562)	SARS-CoV-2 Seronegative Patients (n = 300)	SARS-CoV-2 Seropositive Patients (n = 262)	p
Steroids dose (mg) *	6 (±2.1)	6.1 (±1.75)	5.8 (±2.6)	0.18
Tacrolimus + MMF/MPA + steroids	194 (34.5%)	142 (47.3%)	52 (19.9%)	<0.0001
Serum creatinine (µmol/L)	135.3 (±55.9)	145.2 (±58.2)	124 (±50.9)	<0.0001
Antibody titer before the second dose ****	146.4 (±1543.6)	7.5 (±3.3)	304.4 (±2249)	0.02

Data are expressed as means (±standard deviations) or counts (percentages), as appropriate. Abbreviations: BMI, body mass index; CNi, calcineurin inhibitors; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; mTOR, mammalian target of rapamycin. \* Missing data for one patient, \*\* Missing data for three patients, \*\*\* Missing data for four patients, \*\*\*\* Missing data for two patients.

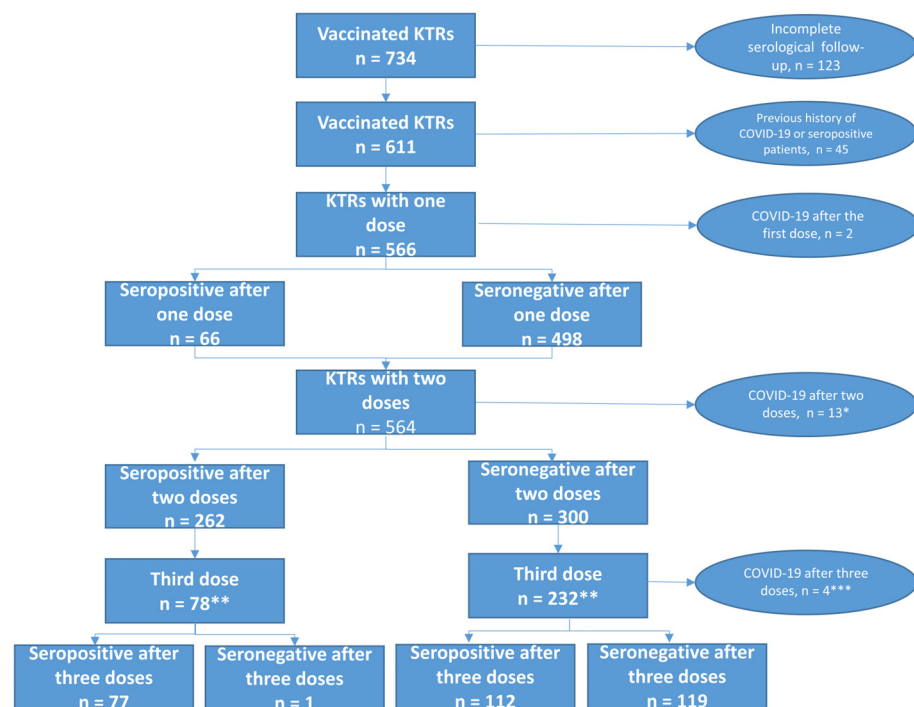


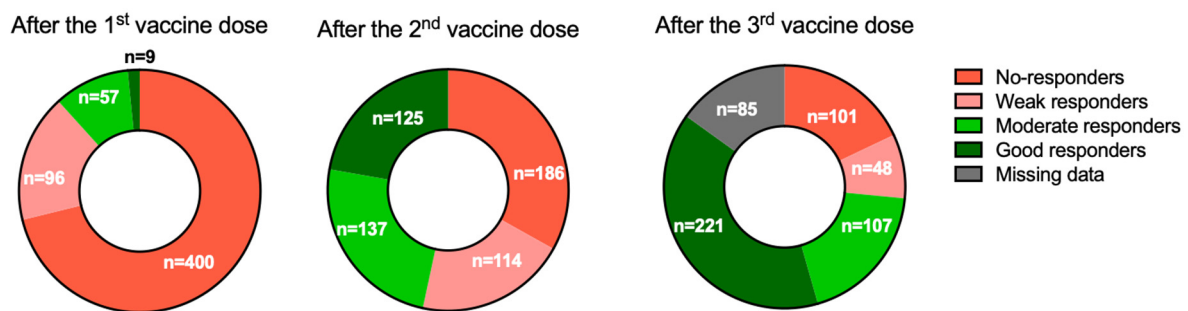
Figure 1. Flow of patients through the study according to the serological response to the mRNA-1273 (Spikevax; Moderna) vaccine. \* Among the 13 patients who developed COVID-19 after the second vaccine dose, one displayed a moderate response (antibody titer: 99 BAU/mL), four were weak responders, and six non-responders. Two KTRs were diagnosed with COVID-19 before the serological assessment within one month and were not included in the analysis. \*\* Only patients with available serology after the third vaccine dose. \*\*\* Among the four patients with COVID-19, two displayed a moderate response and one was a non-responder one month after the third dose. The four patients developed COVID-19 in the month that followed vaccine administration; however, serology was unavailable.

### 3.2. Serological Response after the Second Vaccine Dose

One month after the second vaccine dose, the seropositivity rate increased to 46.6% (n = 262); notably, 125 patients (22.2%) were classified as good responders (Figure 2). The characteristics of patients according to their immune response are presented in Tables 1 and S1. The mean antibody titers increased significantly from 20.7 ± 218.9 BAU/mL to 296.7 ± 1011 BAU/mL after the second dose (p < 0.0001, Figure 3). Titers were significantly higher in patients who had already achieved seropositivity after the first dose compared with those who did not (1939 ± 2265.3 BAU/mL vs. 79.6 ± 268.7 BAU/mL, respectively, p < 0.0001). Multivariate analysis (Table 2) identified the following variables as independently associated with seroconversion after the second dose: treatment with MMF/MPA (OR = 0.29, 95% confidence interval [CI] = 0.15–0.56, p = 0.0002), treatment with tacrolimus



(OR = 0.54; 95% CI = 0.35–0.83,  $p = 0.005$ ), treatment with belatacept (OR = 0.18, 95% CI = 0.04–0.86,  $p = 0.03$ ), treatment with steroids (OR = 0.58, 95% CI = 0.38–0.88,  $p = 0.01$ ), creatinine (for each 100  $\mu\text{mol/L}$  increase; OR = 0.37, 95% CI = 0.25–0.55,  $p < 0.0001$ ), time from transplantation (for each 10-year decrease; OR = 0.57, 95% CI = 0.42–0.77,  $p = 0.0002$ ), and age (for each 10-year increase; OR = 0.82, 95% CI = 0.69–0.97,  $p = 0.02$ ). We also found that tacrolimus and cyclosporine trough levels, as well as MMF/MPA dosages, were lower in patients who achieved seroconversion (Figure 4). Variables associated with vaccine response were used to devise an empirical scale for predicting seroconversion (Table 3). The final score showed a strong association with both seropositivity (AUC = 0.752,  $p < 0.0001$ , Figure 5A) and good response to vaccination (AUC = 0.785,  $p < 0.0001$ , Figure 5B). Patients with a score of 15 or higher were seronegative in 76% of cases.

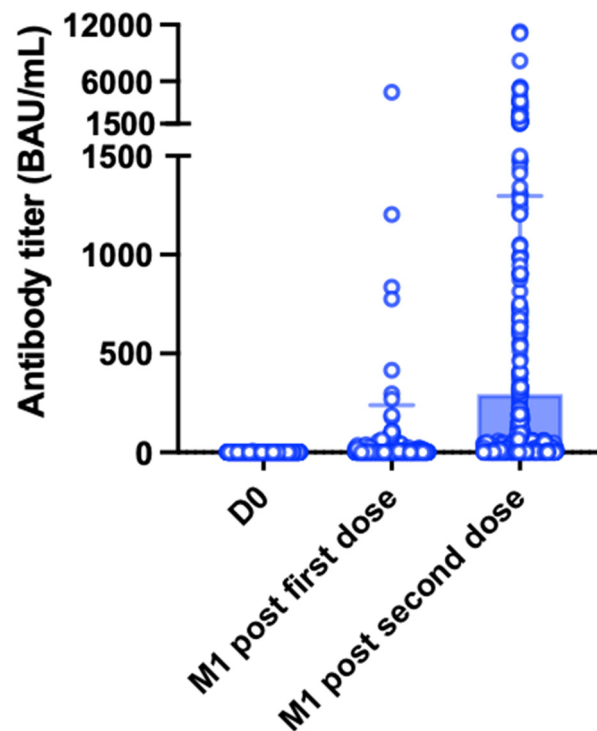


**Figure 2.** Distribution of the 562 KTRs according to the serological response assessed one month after the first, second, and third vaccine doses. Patients who harbored titers < 1 BAU/mL were considered as non-responders; conversely, those with titers between 1 and 7.1 BAU/mL were classified as weak responders. Patients with titers between 7.1 and 143 BAU/mL were considered as moderate responders; conversely, those with titers  $\geq 143$  BAU/mL were classified as good responders.

**Table 2.** Univariate and multivariate analysis of predictors factors for seroconversion after two vaccine doses.

	Univariate Odds Ratio (95% Confidence Interval)	$p$	Multivariate Odds Ratio (95% Confidence Interval)	$p$
Age (for each 10-year increase)	0.93 (0.81–1.05)	0.2	0.82 (0.69–0.97)	0.02
Male sex	1.12 (0.79–1.57)	0.53		
Comorbidities				
BMI (for each 1 $\text{kg/m}^2$ )	0.99 (0.97–1)	0.87		
Cardiovascular disease	1.0 (0.66–1.41)	0.85		
Diabetes	0.57 (0.4–0.81)	0.002	0.70 (0.45–1.06)	0.09
Cancer	0.79 (0.51–1.23)	0.29		
Hypertension	0.9 (0.57–1.41)	0.63		
Time from transplantation (for each 10-year decrease)	0.49 (0.38–0.61)	<0.0001	0.57 (0.42–0.77)	0.0002
First transplantation	1.75 (1.1–2.8)	0.02	1.15 (0.66–2.02)	0.63
Living donor	0.74 (0.48–1.13)	0.17	0.87 (0.53–1.44)	0.60
TAC vs. CS or no CNI	0.46 (0.33–0.65)	<0.0001	0.54 (0.35–0.83)	0.005
MMF/MPA	0.25 (0.16–0.39)	<0.0001	0.29 (0.15–0.56)	0.0002
mTOR inhibitors	3.13 (1.93–5.1)	0.003	1.64 (0.82–3.27)	0.17
Azathioprine	32.5 (1.73–611.5)	0.02		
Belatacept	0.14 (0.03–0.60)	0.008	0.18 (0.04–0.86)	0.03
Steroids	0.42 (0.3–0.6)	0.01	0.58 (0.38–0.88)	0.01
Serum creatinine (for each 100 $\mu\text{mol/L}$ increase)	0.46 (0.31–0.65)	<0.0001	0.37 (0.25–0.55)	<0.0001

Abbreviations: BMI, body mass index; TAC, tacrolimus; CS, cyclosporine; CNI, calcineurin inhibitors; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; mTOR, mammalian target of rapamycin.



**Figure 3.** Antibody titer over time. Assessments were performed on the vaccination day (D0,  $n = 562$ ), one month (M1) after the first dose, and one month after the second dose ( $n = 562$ ). White dots represent individual values, whereas blue bars and the black lines indicate the means and standard deviations, respectively. After the second dose, antibody titers increased significantly from  $20.7 \pm 218.9$  BAU/mL to  $296.7 \pm 1011$  BAU/mL ( $p < 0.0001$ ).

**Table 3.** Variables included in the score for predicting serological response to vaccination.

Variable	Coefficient
Belatacept	5.6
Tacrolimus	1.9
MMF/MPA	3.4
Steroids	1.7
Serum creatinine (for each 100 $\mu\text{mol/L}$ increase)	2.7
Age (for each 10-year increase)	1.2
Time from transplantation (for each 10-year decrease)	-1.75

Abbreviations: MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid.

Thirteen patients developed symptomatic COVID-19 after the second vaccine dose (median interval from vaccination to disease onset: 34 days; range: 4–86 days). Assessment of serological response in a subgroup of eleven patients revealed that six were non-responders, four weak responders, and one a moderate responder (antibody titer: 99.7 BAU/mL). Of the 13 patients, five required hospitalization and four presented with severe disease (oxygen requirements  $> 6$  L/min).

**Examples**

60-year old patient, 2 years post-transplantation, under tacrolimus/MMF/steroids, serum creatinine 150  $\mu\text{mol/L}$ .

$$7.2 - 0.4 + 1.9 + 3.4 + 1.7 + 4.1 = 18$$

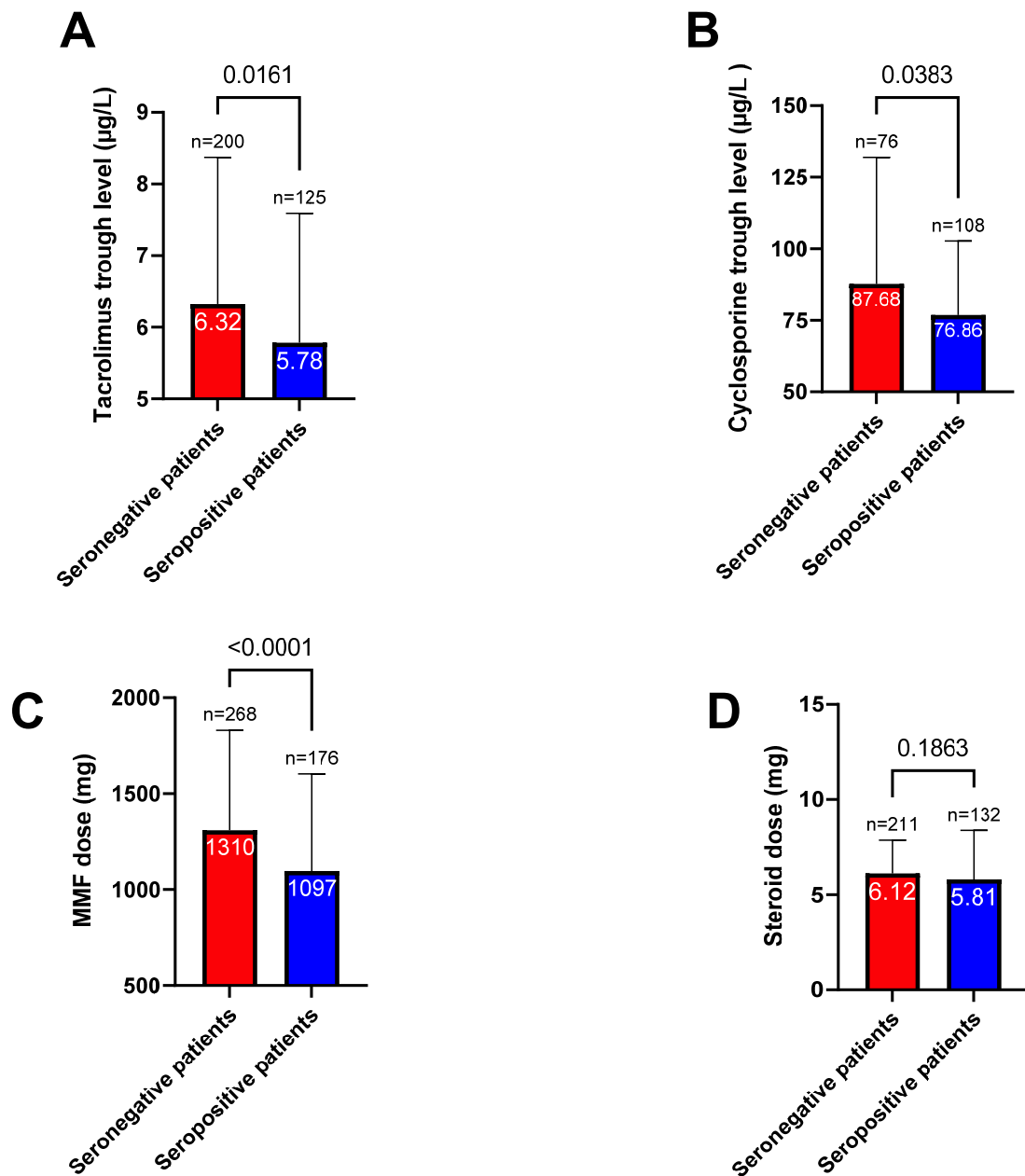


20-year old, 7 years post-transplantation, under belatacept/MMF/steroids, serum creatinine 200 µmol/L.

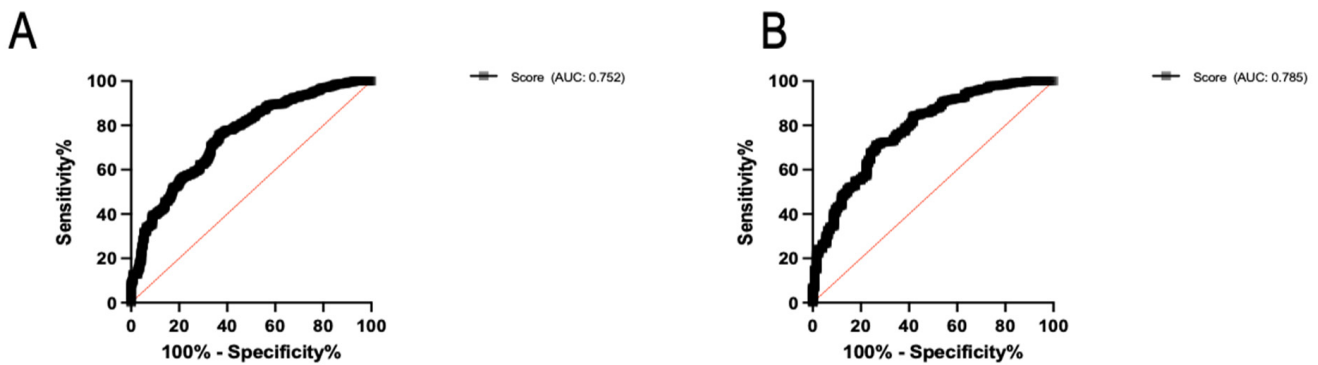
$$2.4 - 0.8 + 5.6 + 3.4 + 1.7 + 5.4 = 17.7$$

35-year old, 11 years post-transplantation, under Cyclosporine/everolimus, serum creatinine 80 µmol/L.

$$3.6 - 1.9 + 0 + 0 + 2.2 = 3.9$$



**Figure 4.** Tacrolimus trough level (A), Cyclosporine trough level (B), mycophenolate mofetil (MMF) dose (C), and steroid dose (D) according to the serological status after the second vaccine dose. Means are marked in white for each column; the number of patients and p values ( $\chi^2$  test) are also reported.



**Figure 5.** (A) Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis of seroconversion (defined by an antibody titer > 7.1 BAU/mL) after two vaccine doses according to the predictive scoring system. The area under curve (AUC) for the score was 0.752 ( $p < 0.0001$ ). (B) ROC curve analysis of good response (defined by an antibody titer  $\geq 143$  BAU/mL) after two vaccine doses according to the predictive scoring system. The area under curve (AUC) for the score was 0.785 ( $p < 0.0001$ ).

### 3.3. Serological Response after the Third Vaccine Dose

Of the 562 KTRs included in the study, 349 received a third vaccine dose and 309 underwent assessment of serological response. The characteristics of patients according to their immune response are summarized in Tables 4 and S2. Before the third dose, 140 (45.3%) KTRs were classified as non-responders, 90 (29.1%) as weak responders, 73 (23.6%) as moderate responders, and 5 (1.6%) as good responders. After the third dose, the seropositivity rate increased to 61.2% (from 78 to 189 patients); notably, 101 patients (32.7%) were classified as good responders. The mean antibody titers increased significantly from  $142 \pm 637$  BAU/mL to  $598 \pm 864$  BAU/mL ( $p < 0.0001$ , Figure 6). Multivariate analysis (Table 5) identified the following variables as independently associated with a lower likelihood of seroconversion after the third dose: treatment with tacrolimus (OR = 0.44, 95% CI = 0.22–0.85,  $p = 0.02$ ), treatment with belatacept (OR = 0.03, 95% CI = 0.003–0.32,  $p = 0.003$ ), treatment with steroids (OR = 0.4, 95% CI = 0.21–0.77;  $p = 0.006$ ), creatinine (for each 100  $\mu\text{mol/L}$  increase; OR = 0.42, 95% CI = 0.23–0.72;  $p = 0.002$ ), time from transplantation (for each 10-year decrease; OR = 0.38, 95% CI = 0.23–0.62;  $p = 0.0002$ ), and age (for each 10-year increase; OR = 0.62, 95% CI = 0.47–0.81;  $p = 0.0004$ ). Conversely, a higher body mass index (for each 1  $\text{m/kg}^2$ ; OR = 1.06, 95% CI = 1.01–1.12,  $p = 0.01$ ) and male sex (OR = 3.07 95% CI = 1.7–5.5,  $p = 0.0002$ ) were associated with a higher probability of seroconversion. Neither doses nor trough concentrations of immunosuppressive drugs were associated with the serological response (Figure 7).

**Table 4.** Patient characteristics according to the absence or presence of seroconversion after three vaccine doses.

	Entire Cohort ( $n = 309$ )	SARS-CoV-2 Seronegative Patients ( $n = 120$ )	SARS-CoV-2 Seropositive Patients ( $n = 189$ )	$p$
Age (years)	57.2 ( $\pm 12.5$ )	59.1 ( $\pm 13$ )	55.9 ( $\pm 12.1$ )	0.02
Male sex	196 (63.4%)	62 (51.7%)	134 (70.9%)	0.0006
Comorbidities				
BMI ( $\text{kg/m}^2$ )	26.7 ( $\pm 6$ )	26.1 ( $\pm 5.6$ )	27 ( $\pm 6.3$ )	0.17
Cardiovascular disease	77 (24.9%)	35 (29.2%)	42 (22.2%)	0.17
Diabetes	124 (40.1%)	52 (43.3%)	72 (38.1%)	0.36
Cancer	61 (19.7%)	28 (23.3%)	33 (17.4%)	0.21
Hypertension	265 (85.8%)	104 (86.7%)	161 (85.2%)	0.72
Time from kidney transplantation (years)	7.9 ( $\pm 7.1$ )	6 ( $\pm 6.2$ )	9.2 ( $\pm 7.4$ )	<0.0001
First transplantation	250 (80.9%)	94 (78.3%)	156 (82.5%)	0.36

Table 4. Cont.

	Entire Cohort (n = 309)	SARS-CoV-2 Seronegative Patients (n = 120)	SARS-CoV-2 Seropositive Patients (n = 189)	p
Living donor	63 (20.4%)	20 (16.7%)	43 (22.8%)	0.2
CNI				0.001
Tacrolimus	201 (65.1%)	89 (74.2%)	112 (59.3%)	
Cyclosporine	87 (28.2%)	20 (16.7%)	67 (35.5%)	
No CNI	21 (6.8%)	11 (9.2%)	10 (5.3%)	
Tacrolimus dose (mg) *	5.6 (±3.3)	6.2 (±3.6)	5.1 (±2.9)	0.02
Tacrolimus trough level (µg/L) *	6.2 (±2)	6.3 (±2)	6.1 (±2)	0.5
Cyclosporine dose (mg)	160 (±57)	185 (±56)	153 (±56)	0.03
Cyclosporine trough level (µg/L)	85.4 (±42.7)	98.1 (±31.3)	81.6 (±45)	0.07
MMF/MPA	266 (86.1%)	113 (94.2%)	153 (81%)	0.001
MMF/MPAs dose (mg) *	1253 (±507)	1290 (±529)	1225 (±490)	0.3
mTOR inhibitors	34 (11%)	6 (5%)	28 (14.8%)	0.01
mTOR inhibitors dose (mg)	2 (±0.9)	1.8 (±0.7)	2 (±0.9)	0.61
mTOR inhibitors trough level (µg/L)	5 (±1.6)	4.9 (±1.4)	5.1 (±1.6)	0.82
Azathioprine	3 (1%)	0	3 (1.6%)	0.17
Belatacept	12 (3.9%)	11 (9.2%)	1 (0.5%)	0.0004
Steroids	213 (68.9%)	99 (82.5%)	114 (60.3%)	<0.0001
Steroids dose (mg) *	6.1 (±2.3)	6.2 (±1.8)	6.1 (±2.7)	0.58
Tacrolimus + MMF/MPA + steroids	137 (44.4%)	73 (60.8%)	64 (33.9%)	<0.0001
Serum creatinine (µmol/L)	139 (±54.2)	150.3 (±62.6)	131.8 (±46.9)	0.003
Antibody titer before the third dose	142 (±637)	10.5 (±23.5)	226 (±804)	0.0003

Data are expressed as means (±standard deviations) or counts (percentages), as appropriate. Abbreviations: BMI, body mass index; CNI, calcineurin inhibitors; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; mTOR, mammalian target of rapamycin. \* Missing data for one patient.

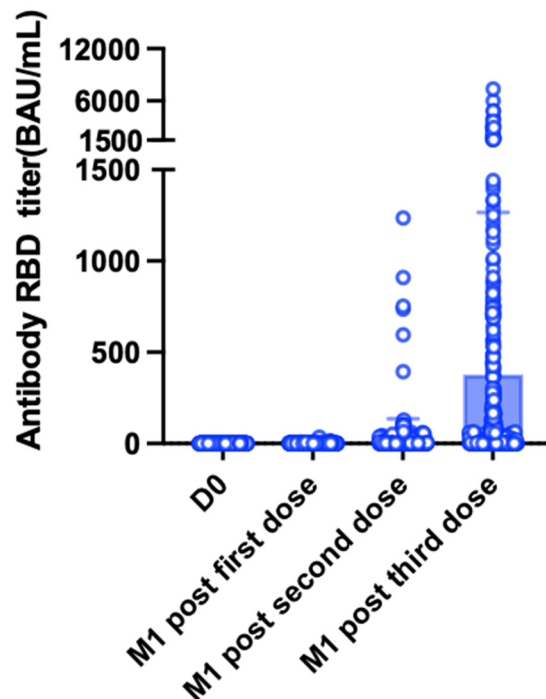
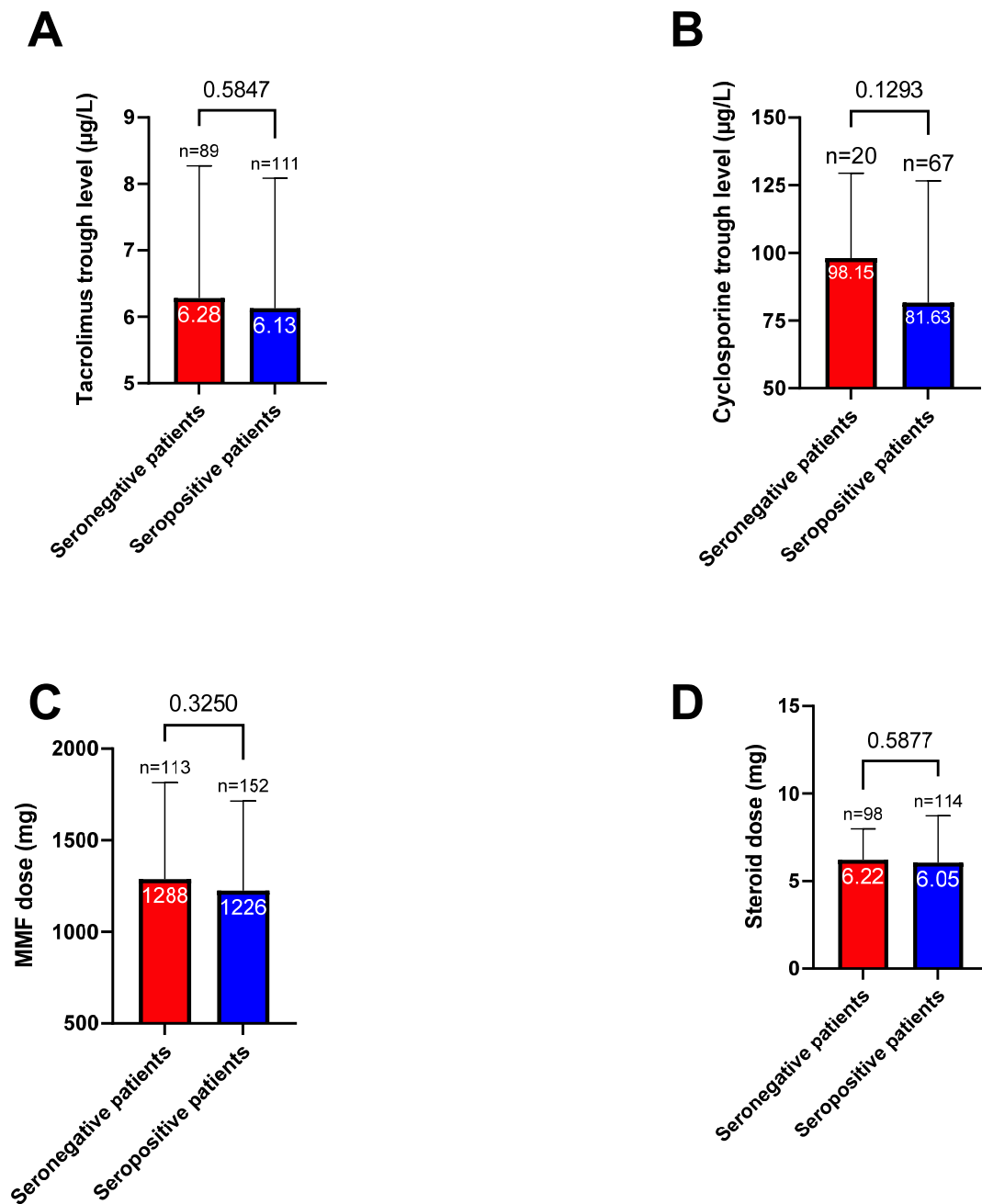


Figure 6. Antibody titer over time. Assessments were performed on the vaccination day (D0, n = 309), one month (M1) after the first dose, one month after the second dose, and one month after the third dose in the subgroup of KTRs who received three vaccine doses. White dots represent individual values, whereas blue bars and the black lines indicate the means and standard deviations, respectively. After the third dose, antibody titers increased significantly from 142 ± 637 BAU/mL to 598 ± 864 BAU/mL (p < 0.0001).



**Figure 7.** Mean tacrolimus trough level (A), Cyclosporine trough level (B), mycophenolate mofetil (MMF) dose (C), and steroids dose (D) according to the serological response after the third vaccine dose. Means are marked in white for each column; the number of patients and  $p$  values ( $\chi^2$  test) are also reported.

Four patients developed symptomatic COVID-19 after the third vaccine dose (interval from vaccination to disease onset: 45, 101, and 113 days, respectively; the interval was unknown for the remaining patient). Of them, three required hospitalization and two were admitted to an intensive care unit; one ultimately died of disease. The serological response was available for three of the four patients; the results revealed that one was a non-responder (antibody titer: 1 BAU/mL) and the other two a moderate responder (antibody titer: 40.4 BAU/mL and 8 BAU/mL).

**Table 5.** Univariate and multivariate analysis of predictors factors for seroconversion after three vaccine doses.

	Univariate Odds Ratio (95% Confidence Interval)	<i>p</i>	Multivariate Odds Ratio (95% Confidence Interval)	<i>p</i>
Age (for each 10-year increase)	0.81 (0.67–0.98)	0.03	0.62 (0.47–0.81)	0.0004
Male sex	2.28 (1.42–3.68)	0.0007	3.07 (1.7–5.5)	0.0002
Comorbidities				
BMI (for each 1 kg/m <sup>2</sup> )	1.03 (0.99–1.07)	0.18	1.06 (1.01–1.12)	0.01
Cardiovascular disease	0.69 (0.41–1.17)	0.17	1.31 (0.68–2.52)	0.42
Diabetes	0.81 (0.51–1.28)	0.36		
Cancer	0.67 (0.4–1.23)	0.21		
Hypertension	0.89 (0.45–1.70)	0.72		
Time from transplantation (for each 10-year decrease)	0.46 (0.30–0.67)	0.0002	0.38 (0.23–0.62)	0.0002
First transplantation	1.31 (0.73–2.32)	0.36		
Living donor	1.47 (0.83–2.7)	0.2	1.49 (0.72–3.05)	0.28
TAC vs. CS or no CNI	0.51 (0.30–0.83)	0.0078	0.44 (0.22–0.85)	0.02
MMF/MPA	0.26 (0.10–0.58)	0.002	0.27 (0.06–1.16)	0.08
mTOR inhibitors	3.30 (1.41–9.07)	0.01	1.4 (0.3–6.78)	0.68
Belatacept	0.05 (0.003–0.28)	0.005	0.03 (0.003–0.32)	0.003
Steroids	0.32 (0.18–0.55)	<0.0001	0.4 (0.21–0.77)	0.006
Serum creatinine (for each 100 µmol/L increase)	0.53 (0.33–0.81)	0.005	0.42 (0.23–0.72)	0.002

Abbreviations: BMI, body mass index; TAC, tacrolimus; CS, cyclosporine; CNI, calcineurin inhibitors; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; mTOR, mammalian target of rapamycin.

### 3.4. Overall Response in the Entire Cohort

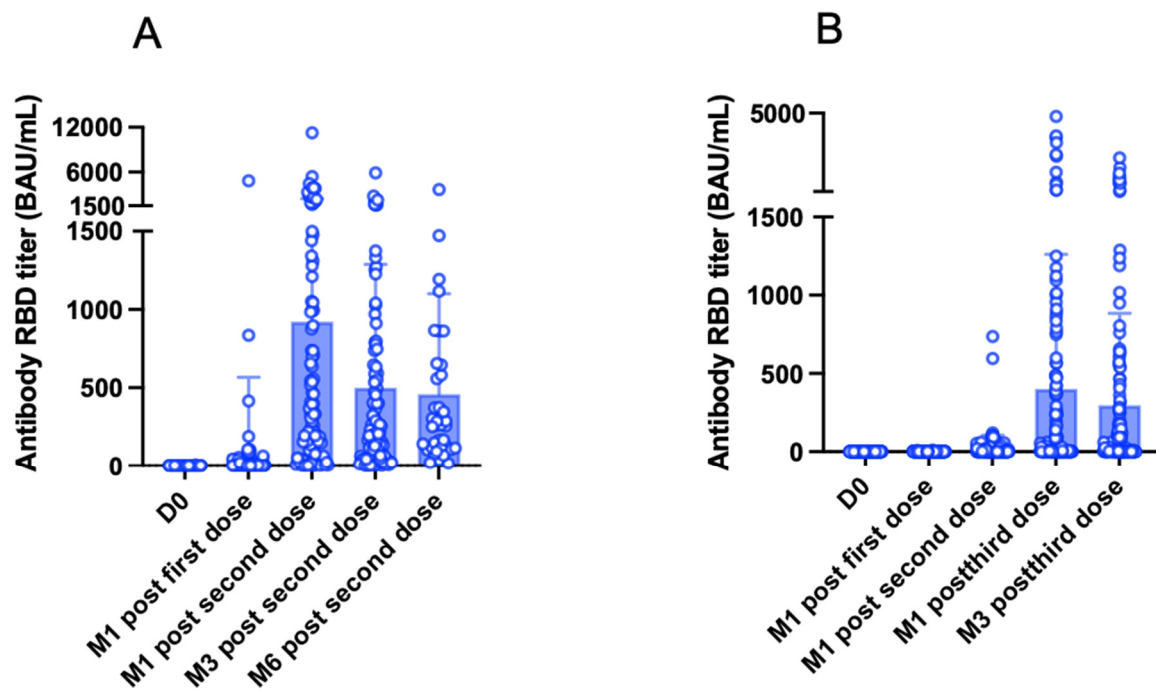
Of the 477 patients who had serology data after the last vaccine dose, the seropositivity rate was 69% ( $n = 328$ ); of them, 221 (46.3%) were good responders.

### 3.5. Six-Month Antibody Kinetics after the Second Vaccine Dose

The kinetics of anti-RBD antibodies was assessed in 100 KTRs after a mean interval of  $97 \pm 15$  days from the second vaccine dose (M3). From M1 to M3, mean antibody titers decreased significantly from  $992.8 \pm 1546$  BAU/mL to  $499.7 \pm 788.6$  BAU/mL ( $p < 0.0001$ , Figure 8a). The number of good responders at M1 and M3 was 72 and 62, respectively. In 38 patients, mean antibody titers were also assessed after a mean interval of  $183.6 \pm 16.4$  days from the second vaccine dose (M6). From M3 to M6, mean antibody titers decreased significantly from  $754.6 \pm 673.3$  BAU/mL to  $263.1 \pm 598.1$  BAU/mL ( $p = 0.01$ , Figure 8a). With the exception of one patient, all KTRs were good responders at both M3 and M6.

### 3.6. Three-Month Antibody Kinetics after the Third Vaccine Dose

The kinetics of anti-RBD antibodies were assessed in 136 KTRs after a mean interval of  $109 \pm 18$  days from the third vaccine dose (M3). From M1 to M3, mean antibody titers decreased significantly from  $401.7 \pm 860.2$  BAU/mL to  $296.1 \pm 588$  BAU/mL ( $p = 0.01$ , Figure 8b). The number of good responders at M1 and M3 was 48 and 45, respectively.



**Figure 8.** Antibody titers over time. (A) Assessments were performed on the vaccination day (D0), one month (M1) after the first dose, one month after the second dose, three months (M3) after the second dose ( $n = 100$ ), and six months (M6) after the second dose ( $n = 38$ ). White dots represent individual values, whereas blue bars and the black lines indicate the means standard deviations, respectively. In the subgroup of 100 patients, antibody titers decreased significantly from  $992.8 \pm 1546$  BAU/mL at one month to  $499.7 \pm 788.6$  BAU/mL at three months ( $p < 0.0001$ ). A further decrease was observed between three and six months in the subgroup of 38 patients (from  $754.6 \pm 673.3$  BAU/mL to  $263.1 \pm 598.1$  BAU/mL, respectively). (B) Assessments were performed on the vaccination day (D0), one month (M1) after the first dose, one month (M1) after the second dose, one month (M1) after the third dose, and three months (M3) after the third dose in a subgroup of 136 patients. White dots represent individual values, whereas blue bars and the black lines indicate the means and standard deviations, respectively. Antibody titers decreased significantly from  $401.7 \pm 860.2$  BAU/mL at M1 to  $296.1 \pm 588$  BAU/mL at M3 ( $p = 0.01$ ).

#### 4. Discussion

In the present study, we examined the humoral response elicited by two and three doses of an anti-SARS-CoV-2 mRNA-based vaccine in a large single-center cohort of KTRs. Both the seroconversion rate and the magnitude of the antibody response were taken into account. We also investigated the main predictors of humoral response and the antibody kinetics over time.

Of the 562 KTRs who were monitored after two vaccine doses, the seropositivity rate was as low as 46.6% and the antibody response was generally weak. While immunosuppressive therapy with belatacept and antimetabolites was independently associated with a less pronounced antibody response, tacrolimus and steroids may have produced synergistic effects. Moreover, a lower immune response was associated with elevated through levels of calcineurin inhibitors and high MMF/MPA doses, as well as older age and a reduced kidney function. These findings are in keeping with published data showing that the seroconversion rates of solid organ transplant (SOT) recipients who had received two mRNA-based vaccine doses ranged between 30% and 48% [6,7,13,14] However, a seroconversion rate as low as 6% has been described for SOT recipients being treated with belatacept [15,16]. The use of antimetabolites has been shown to reduce the humoral response to vaccination in a dose-dependent fashion both in SOT and non-SOT recipients [7,17,18]. However, the potential impact of CNI through levels on antibody response remains controversial [7,19].

In this study, we found that a third vaccine dose given to KTRs who were originally classified as non- or weak responders increased the seroconversion rate to 69% in the entire cohort. Previous investigations conducted in SOT patients have administered the third dose without specifically taking into account the response to the previous two doses. Their findings revealed that the booster elicited enhanced T cell and neutralizing antibody responses [10,11,20,21]. The observed seroconversion rates (62–69%) are in accordance with those reported in our study [11,20,21]. We also found that a lower antibody response was independently associated with the use of immunosuppressive drugs (i.e., belatacept and tacrolimus), kidney dysfunction, a longer interval from transplantation, female sex, and age. Conversely, MMF/MPA doses and CNI through levels were not. These data are generally consistent with those reported in the literature. Masset et al. [20] have previously shown a lower antibody response in female recipients as well as in patients with kidney dysfunction and lymphopenia. Another study found that age, kidney dysfunction, MPA, belatacept, and a low lymphocyte count were associated with an impaired response to vaccination [11].

In addition to seroconversion rate, we also focused on the magnitude of antibody response. This was motivated by the observation that COVID-19 occurred even in some KTRs who successfully seroconverted. Patients with titers  $\geq 143$  BAU/mL were considered as good responders because this cutoff has been shown to correlate with the appearance of neutralizing antibodies against the main variants of concerns at the time of study [22] and has been associated with a vaccine protection  $>70\%$  [12,23]. While the frequency of good responders increased from 22.2% to 46.5% after the third dose, more than 50% of the study participants still failed to achieve adequate protection. The increase rate of good responders after each vaccine dose and the satisfactory response observed in KTRs with a previous history of COVID-19 (even after a single administration) suggested a significant effect of the antigen dose [24]. Several strategies have been proposed to increase the effectiveness of anti-SARS-CoV-2 vaccines among people who are immunocompromised. In this regard, a fourth dose can improve immunogenicity especially in the subset of patients who experienced a weak response after the third dose [25]. Another strategy to provide protection is the use of anti-SARS-CoV-2 monoclonal antibodies. Transient immunosuppression reduction may also improve the immune response to vaccination, albeit at the expense of an increased rejection risk. In a small cohort of 29 KTRs, a fourth dose of SARS-CoV-2 vaccine administered during MMF/MPA hold was associated with a seroconversion rate as high as 76% [26]. A randomized clinical trial to evaluate this strategy is currently ongoing [27]. In patients with rheumatic and musculoskeletal diseases, a temporary hold of MMF increased the humoral response to SARS-CoV-2 vaccination from 65% to 92% [18].

In the current study, we were able to devise a scoring system to predict the response of KTRs after two vaccine doses. When the score was  $>15$ , 76% of our patients were unable to mount an adequate humoral protection. Thus, this scale can be used to identify KTRs who are in need of additional protection strategies. Antibody kinetics was assessed at M3 after the second and third doses and, in a subgroup of patients, until M6 after the second dose. The results revealed that antibody titers decreased by approximately 50% at M3, followed by another 50% decline between M3 and M6. In a study of 312 patients in whom antibody kinetics was assessed at M3 and M6 after the second dose, the seropositive rate at 6 months remained stable (61%) [28,29]. Our results on the antibody kinetics after the third dose are in line with those of Kamar et al. [30] who found decreased antibody titers at M3. However, these findings are different from those reported for KTRs with a history of COVID-19—who were able to maintain a steady antibody response at M6 [31]. The observed antibody decline in vaccinated KTRs calls to offer booster doses either according to antibody titers or at regular intervals (e.g., every six months).

One of the strengths of our study was the inclusion of a large cohort of KTRs in whom the kinetics of the antibody response was thoroughly analyzed after two and three vaccine doses. Moreover, we were able to identify several variables that were independently



associated with an increased risk of inadequate humoral protection. We also correlated the occurrence of COVID-19 with the inability to mount a sufficient response to vaccination. Our findings may have relevant implications to devise individualized vaccination strategies following the second dose. However, we were unable to evaluate both antibody neutralizing activity and T-cell responses.

In conclusion, a third dose vaccine dose was found to elicit a more pronounced antibody response against SARS-CoV-2 in KTRs. While these findings suggest an antigen dose effect on immunogenicity, a satisfactory protection was achieved in less than a half of the study participants. A high burden of comorbidities and immunosuppression was correlated with a weaker antibody response. A fourth vaccine dose and/or pre-exposure prophylaxis with monoclonal antibodies should be considered for KTRs who remain unprotected after three doses. Since protective antibodies decreased over time, further studies are necessary to investigate the benefits and timing of booster doses.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jpm12071107/s1>, Table S1. Patient characteristics according to the antibody response after two vaccine doses (non-responders, weak responders, and moderate responders vs. good responders). Table S2. Patient characteristics according to the antibody response after three vaccine doses (non-responders, weak responders, and moderate responders vs. good responders).

**Author Contributions:** Study concept: I.B. and S.C.; Study design: I.B., S.F.-K. and S.C.; Data collection: I.B., G.G.-V., R.P., J.M., N.C., J.O., P.P., L.B.-P., F.H., S.C. and B.M.; Data analysis: I.B. and S.C.; Data management: I.B.; Manuscript writing: I.B. and S.C.; Critical revision for important intellectual content: all authors; Study supervision: S.C.; Funding acquisition: S.F.-K. and S.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was registered at *Clinicaltrials.gov* (registration number: NCT04828460) and received ethical approval from the local Institutional Review Board (approval number: CE-2021-9).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

**Acknowledgments:** We wish to thank the clinical research team (Danielle Roy, Annie Menguy, and Hugo Servais), the nurses (Sandra Ludwiller, Muriel Morvan, Karima Kedjam, Lucile Steinmetz, and Christelle Appenzeller), and the secretaries (Amandine Bigot, Calypso Chavez, and Agathe Pillon) at the Department of Nephrology and Transplantation, Strasbourg University Hospital (Strasbourg, France) for their invaluable help and dedication during the vaccination program and patient follow-up.

**Conflicts of Interest:** The authors of this manuscript have no conflict of interest to disclose.

## References

1. Caillard, S.; Anglicheau, D.; Matignon, M.; Durrbach, A.; Greze, C.; Frimat, L.; Thaunat, O.; Legris, T.; Moal, V.; Westeel, P.F.; et al. An initial report from the French SOT COVID Registry suggests high mortality due to COVID-19 in recipients of kidney transplants. *Kidney Int.* **2020**, *98*, 1549–1558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Benotmane, I.; Perrin, P.; Vargas, G.G.; Bassand, X.; Keller, N.; Lavaux, T.; Ohana, M.; Bedo, D.; Baldacini, C.; Sagnard, M.; et al. Biomarkers of Cytokine Release Syndrome Predict Disease Severity and Mortality From COVID-19 in Kidney Transplant Recipients. *Transplantation* **2021**, *105*, 158–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Jackson, L.A.; Anderson, E.J.; Roupheal, N.G.; Roberts, P.C.; Makhene, M.; Coler, R.N.; McCullough, M.P.; Chappell, J.D.; Denison, M.R.; Stevens, L.J.; et al. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2—Preliminary Report. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 1920–1931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



4. Benotmane, I.; Gautier-Vargas, G.; Cognard, N.; Olagne, J.; Heibel, F.; Braun-Parvez, L.; Martzloff, J.; Perrin, P.; Moulin, B.; Fafi-Kremer, S.; et al. Weak anti-SARS-CoV-2 antibody response after the first injection of an mRNA COVID-19 vaccine in kidney transplant recipients. *Kidney Int.* **2021**, *99*, 1487–1489. [[CrossRef](#)]
5. Benotmane, I.; Gautier-Vargas, G.; Cognard, N.; Olagne, J.; Heibel, F.; Braun-Parvez, L.; Martzloff, J.; Perrin, P.; Moulin, B.; Fafi-Kremer, S.; et al. Low immunization rates among kidney transplant recipients who received 2 doses of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *Kidney Int.* **2021**, *99*, 1498–1500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Boyarsky, B.J.; Werbel, W.A.; Avery, R.K.; Tobian, A.A.R.; Massie, A.B.; Segev, D.L.; Garonzik-Wang, J.M. Antibody Response to 2-Dose SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Series in Solid Organ Transplant Recipients. *JAMA* **2021**, *325*, 2204. [[CrossRef](#)]
7. Rozen-Zvi, B.; Yahav, D.; Agur, T.; Zingerman, B.; Ben-Zvi, H.; Atamna, A.; Tau, N.; Mashraki, T.; Neshet, E.; Rahamimov, R. Antibody response to SARS-CoV-2 mRNA vaccine among kidney transplant recipients: A prospective cohort study. *Clin. Microbiol. Infect.* **2021**, *27*, 1173.e1–1173.e4. [[CrossRef](#)]
8. Caillard, S.; Chavarot, N.; Bertrand, D.; Kamar, N.; Thaunat, O.; Moal, V.; Masset, C.; Hazzan, M.; Gatault, P.; Sicard, A.; et al. Occurrence of severe COVID-19 in vaccinated transplant patients. *Kidney Int.* **2021**, *100*, 477–479. [[CrossRef](#)]
9. Benotmane, I.; Gautier, G.; Perrin, P.; Olagne, J.; Cognard, N.; Fafi-Kremer, S.; Caillard, S. Antibody Response After a Third Dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine in Kidney Transplant Recipients with Minimal Serologic Response to 2 Doses. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2021**, *326*, 1063. [[CrossRef](#)]
10. Hall, V.G.; Ferreira, V.H.; Ku, T.; Ierullo, M.; Majchrzak-Kita, B.; Chaparro, C.; Selzner, N.; Schiff, J.; McDonald, M.; Tomlinson, G.; et al. Randomized Trial of a Third Dose of mRNA-1273 Vaccine in Transplant Recipients. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 1244–1246. [[CrossRef](#)]
11. Del Bello, A.; Abravanel, F.; Marion, O.; Couat, C.; Esposito, L.; Lavayssière, L.; Izopet, J.; Kamar, N. Efficiency of a boost with a third dose of anti-SARS-CoV-2 messenger RNA-based vaccines in solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **2021**, *22*, 322–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Feng, S.; Phillips, D.J.; White, T.; Sayal, H.; Aley, P.K.; Bibi, S.; Dold, C.; Fuskova, M.; Gilbert, S.C.; Hirsch, I.; et al. Correlates of protection against symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 2032–2040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Marion, O.; del Bello, A.; Abravanel, F.; Couat, M.C.; Faguer, S.; Esposito, L.; Hebrat, A.L.; Izopet, J.; Kamar, N. Safety and Immunogenicity of Anti-SARS-CoV-2 Messenger RNA Vaccines in Recipients of Solid Organ Transplants. *Ann. Intern. Med.* **2021**, *174*, 1336–1338. [[CrossRef](#)]
14. Cucchiari, D.; Egri, N.; Bodro, M.; Herrera, S.; del Risco-Zevallos, J.; Casals-Urquiza, J.; Cofan, F.; Moreno, A.; Rovira, J.; Banon-Maneus, E.; et al. Cellular and Humoral Response After mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine in Kidney Transplant Recipients. *Am. J. Transplant.* **2021**, *21*, 2727–2739. [[CrossRef](#)]
15. Chavarot, N.; Ouedrani, A.; Marion, O.; Leruez-Ville, M.; Vilain, E.; Baaziz, M.; del Bello, A.; Burger, C.; Sberro-Soussan, R.; Martinez, F.; et al. Poor Anti-SARS-CoV-2 Humoral and T-cell Responses After 2 Injections of mRNA Vaccine in Kidney Transplant Recipients Treated with Belatacept. *Transplantation* **2021**, *105*, e94–e95. [[CrossRef](#)]
16. Ou, M.T.; Boyarsky, B.J.; Chiang, T.P.; Bae, S.; Werbel, W.A.; Avery, R.K.; Tobian, A.A.; Massie, A.B.; Segev, D.L.; Garonzik-Wang, J.M. Immunogenicity and Reactogenicity After SARS-CoV-2 mRNA Vaccination in Kidney Transplant Recipients Taking Belatacept. *Transplantation* **2021**, *105*, 2119–2123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Kantauskaitė, M.; Müller, L.; Kolb, T.; Fischer, S.; Hillebrandt, J.; Ivens, K.; Andree, M.; Luedde, T.; Orth, H.M.; Adams, O.; et al. Intensity of mycophenolate mofetil treatment is associated with an impaired immune response to SARS-CoV-2 vaccination in kidney transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **2021**, *22*, 634–639. [[CrossRef](#)]
18. Connolly, C.M.; Chiang, T.P.-Y.; Boyarsky, B.J.; Ruddy, J.A.; Teles, M.; Alejo, J.L.; Massie, A.; Werbel, W.A.; Shah, A.A.; Christopher-Stine, L.; et al. Temporary hold of mycophenolate augments humoral response to SARS-CoV-2 vaccination in patients with rheumatic and musculoskeletal diseases: A case series. *Ann. Rheum. Dis.* **2021**, *81*, 293–295. [[CrossRef](#)]
19. Hod, T.; Ben-David, A.; Olmer, L.; Levy, I.; Ghinea, R.; Mor, E.; Lustig, Y.; Rahav, G. Humoral Response of Renal Transplant Recipients to the BNT162b2 SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Using Both RBD IgG and Neutralizing Antibodies. *Transplantation* **2021**, *105*, e234–e243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Masset, C.; Kerleau, C.; Garandeau, C.; Ville, S.; Cantarovich, D.; Hourmant, M.; Kervella, D.; Houzet, A.; Guillot-Gueguen, C.; Guihard, I.; et al. A third injection of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in kidney transplant recipients improves the humoral immune response. *Kidney Int.* **2021**, *100*, 1132–1135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Bertrand, D.; Hamzaoui, M.; Lemée, V.; Lamulle, J.; Laurent, C.; Etienne, I.; Lemoine, M.; Lebourg, L.; Hanoy, M.; le Roy, F.; et al. Antibody and T-cell response to a third dose of SARS-CoV-2 mRNA BNT162b2 vaccine in kidney transplant recipients. *Kidney Int.* **2021**, *100*, 1337–1340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Gallais, F.; Gantner, P.; Bruel, T.; Velay, A.; Planas, D.; Wendling, M.-J.; Bayer, S.; Solis, M.; Laugel, E.; Reix, N.; et al. Evolution of antibody responses up to 13 months after SARS-CoV-2 infection and risk of reinfection. *eBioMedicine* **2021**, *71*, 103561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Dimeglio, C.; Herin, F.; Miedougé, M.; Martin-Blondel, G.; Soulat, J.-M.; Izopet, J. Protection of Healthcare Workers Against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Reinfection. *Clin. Infect. Dis.* **2021**, *73*, 1323–1324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Benotmane, I.; Vargas, G.G.; Gallais, F.; Gantner, P.; Cognard, N.; Olagne, J.; Velay, A.; Heibel, F.; Braun-Parvez, L.; Martzloff, J.; et al. Strong antibody response after a first dose of a SARS-CoV-2 mRNA-based vaccine in kidney transplant recipients with a previous history of COVID-19. *Am. J. Transplant.* **2021**, *21*, 3808–3810. [[CrossRef](#)]
25. Caillard, S.; Thauinat, O.; Benotmane, I.; Masset, C.; Blancho, G. Antibody Response to a Fourth Messenger RNA COVID-19 Vaccine Dose in Kidney Transplant Recipients: A Case Series. *Ann. Intern. Med.* **2022**, *175*, 455–456. [[CrossRef](#)]
26. Schrezenmeier, E.; Rincon-Arevalo, H.; Jens, A.; Stefanski, A.-L.; Hammett, C.; Osmanodja, B.; Koch, N.; Zukunft, B.; Beck, J.; Oellerich, M.; et al. Temporary antimetabolite treatment hold boosts SARS-CoV-2 vaccination-specific humoral and cellular immunity in kidney transplant recipients. *JCI Insight* **2022**, *7*. [[CrossRef](#)]
27. Yahav, D.; Rozen-Zvi, B.; Mashraki, T.; Atamna, A.; Ben-Zvi, H.; Bar-Haim, E.; Rahamimov, R. Immunosuppression reduction when administering a booster dose of the BNT162b2 mRNA SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant recipients without adequate humoral response following two vaccine doses: Protocol for a randomised controlled trial (BECAME study). *BMJ Open* **2021**, *11*, e055611. [[CrossRef](#)]
28. Alejo, J.L.; Mitchell, J.; Chiang, T.P.-Y.; Abedon, A.T.; Sidoti, C.N.; Boyarsky, B.J.; Avery, R.K.; Tobian, A.A.; Levan, M.L.; Warren, D.S.; et al. Six-month Antibody Kinetics and Durability in SARS-CoV-2 mRNA Vaccinated Solid Organ Transplant Recipients. *Transplantation* **2021**, *106*, e109–e110. [[CrossRef](#)]
29. Boyarsky, B.J.; Chiang, T.P.-Y.; Teles, A.T.; Greenberg, R.S.; Krach, M.R.; Ou, M.T.; Massie, A.B.; Tobian, A.A.R.; Garonzik-Wang, J.M.; Segev, D.L.; et al. Antibody Kinetics and Durability in SARS-CoV-2 mRNA Vaccinated Solid Organ Transplant Recipients. *Transplantation* **2021**, *105*, e137–e138. [[CrossRef](#)]
30. Kamar, N.; Abravanel, F.; Marion, O.; Esposito, L.; Hebral, A.L.; Médrano, C.; Guitard, J.; Lavayssière, L.; Cointault, O.; Nogier, M.B.; et al. Anti-SARS-CoV-2 spike protein and neutralizing antibodies at 1 and 3 months after three doses of SARS-CoV-2 vaccine in a large cohort of solid organ transplant patients. *Am. J. Transplant.* **2022**, *22*, 1467–1474. [[CrossRef](#)]
31. Benotmane, I.; Vargas, G.G.; Velay, A.; Wendling, M.; Perrin, P.; Fafi-Kremer, S.; Caillard, S. Persistence of SARS-CoV-2 antibodies in kidney transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **2020**, *21*, 2307–2310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Supplementary Table S1. Patient characteristics according to the antibody response after two vaccine doses (non-responders, weak responders, and moderate responders *versus* good responders)

	Antibody titer		p
	<143 BAU (n = 437)	>143 BAU (n = 125)	
Age (years)	56.9 (±12.7)	55.9 (±14.6)	0.51
Male sex	262 (60%)	82 (66%)	0.25
Comorbidities			
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.6 (±5.72)	26.7 (±5.59)	0.83
Cardiovascular disease	114 (26%)	34 (27%)	0.8
Diabetes	174 (40%)	30 (24%)	<0.01
Cancer	80 (18%)	18 (14%)	0.31
Hypertension	370 (85%)	102 (82%)	0.41
Time from kidney transplantation (years)	7.97 (±7.06)	14.5 (±9.08)	<0.001
First transplantation	363 (83%)	111 (89%)	0.12
Living donor	86 (20%)	20 (16%)	0.35
CNI			<0.001
Tacrolimus	285 (65%)	43 (34%)	
Ciclosporin	119 (27%)	65 (52%)	-
No CNI	33 (7.6%)	17 (14%)	-
Tacrolimus dose (mg)*	5.47 (±3.19)	4.75 (±2.67)	0.12
Tacrolimus trough level (µg/L)**	6.17 (±1.99)	5.71 (±1.83)	0.14
Ciclosporin dose (mg)	154 (±57.8)	146 (±51.6)	0.34
Ciclosporin trough level (µg/L)	85.0 (±39.2)	74.5 (±24.3)	0.027
MMF/MPA	370 (85%)	78 (62%)	<0.001
MMF/MPAs dose (mg)**	1262 (±525)	1046 (±491)	<0.001
mTOR inhibitors	60 (14%)	29 (23%)	0.011
mTOR inhibitors dose (mg)*	1262 (±525)	1046 (±491)	<0.001
mTOR inhibitors trough level (µg/L)	5.02 (±1.45)	5.62 (±1.67)	0.11
Azathioprine	5 (1.1%)	8 (6.4%)	<0.01
Belatacept	17 (3.9%)	1 (0.81%)	0.14
Steroids	292 (67%)	52 (42%)	<0.001
Steroids dose (mg)*	6.11 (±2.13)	5.36 (±1.86)	<0.01
Tacrolimus+MMF/MPA+steroids	177 (41%)	17 (14%)	<0.001
Serum creatinine (µmol/L)	139 (±57.6)	122 (±47.1)	<0.001
Antibody titer before the second dose ****	1.24 (±1.11)	88.8 (±459)	0.035

Data are expressed as means (± standard deviations) or counts (percentages), as appropriate.

Abbreviations: BMI, body mass index; CNI, calcineurin inhibitors; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; mTOR, mammalian target of rapamycin.

\*Missing data for one patient, \*\*Missing data for three patients, \*\*\*Missing data for four patients, \*\*\*\*Missing data for two patients.

Supplementary Table S2. Patient characteristics according to the antibody response after three vaccine doses (non-responders, weak responders, and moderate responders *versus* good responders)

	Antibody titer >143 BAU (n = 101)	Antibody titer <143 BAU (n = 208)	p
Age (years)	56.6 ( $\pm$ 10.9)	57.5 ( $\pm$ 13.3)	0.5
Male sex	80 (79%)	117 (56%)	<0.001
Comorbidities			
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.6 ( $\pm$ 5.82)	26.2 ( $\pm$ 6.04)	0.05
Cardiovascular disease	22 (22%)	56 (27%)	0.33
Diabetes	39 (39%)	85 (41%)	0.7
Cancer	19 (19%)	42 (20%)	0.77
Hypertension	89 (88%)	176 (85%)	0.41
Time from kidney transplantation (years)	10.3 ( $\pm$ 8.20)	6.75 ( $\pm$ 6.14)	<0.001
First transplantation	88 (87%)	162 (78%)	0.052
Living donor	20 (20%)	43 (21%)	0.86
CNI			<0.001
Tacrolimus	49 (49%)	152 (73%)	-
Ciclosporin	45 (45%)	42 (20%)	-
No CNI	7 (6.9%)	14 (6.7%)	
Tacrolimus dose (mg)*	4.98 ( $\pm$ 2.77)	5.76 ( $\pm$ 3.41)	0.11
Tacrolimus trough level ( $\mu$ g/L)**	6.30 ( $\pm$ 2.11)	6.16 ( $\pm$ 1.92)	0.69
Ciclosporin dose (mg)	154 ( $\pm$ 61.9)	164 ( $\pm$ 56.1)	0.4
Ciclosporin trough level ( $\mu$ g/L)	79.3 ( $\pm$ 52.4)	92.0 ( $\pm$ 28.0)	0.16
MMF/MPA	84 (83%)	182 (88%)	0.3
MMF/MPAs dose (mg)*	1277 ( $\pm$ 492)	1240 ( $\pm$ 513)	0.58
mTOR inhibitors	12 (12%)	22 (11%)	0.73
mTOR inhibitor dose (mg)	1.83 ( $\pm$ 0.72)	2.09 ( $\pm$ 0.95)	0.54
mTOR inhibitor trough level ( $\mu$ g/L)	5.42 ( $\pm$ 1.87)	4.81 ( $\pm$ 1.36)	0.41
Azathioprine	2 (2%)	1 (0.48%)	0.25
Belatacept	1 (0.99%)	11 (5.3%)	0.11
Steroids	54 (53%)	159 (76%)	<0.001
Steroids dose (mg)*	6.23 ( $\pm$ 3.21)	6.10 ( $\pm$ 1.89)	0.77
Tacrolimus+MMF/MPA+steroids	28 (28%)	109 (52%)	<0.001
Serum creatinine ( $\mu$ mol/L)	127 ( $\pm$ 44.5)	145 ( $\pm$ 57.3)	<0.01
Antibody titer before the third dose	57.3 ( $\pm$ 152)	2.20 ( $\pm$ 3.5)	<0.001

Data are expressed as means ( $\pm$  standard deviations) or counts (percentages), as appropriate. Abbreviations: BMI, body mass index; CNI, calcineurin inhibitors; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; mTOR, mammalian target of rapamycin.

\*Missing data for one patient, \*\*Missing data for three patients.

## **B. Réponse sérologique après une première dose d'un vaccin à base d'ARNm du SARS-CoV-2 chez des transplantés rénaux ayant des antécédents de COVID-19**

### *1) Rationnel et objectifs de l'étude*

Avant l'émergence des variants delta et omicron, de multiples études ont montré qu'une seule dose d'un vaccin à base d'ARNm est suffisante pour déclencher une réponse immunologique robuste chez les sujets immunocompétents ayant un antécédent de COVID-19.<sup>639,640</sup> Les autorités de santé françaises avaient alors recommandé un schéma vaccinal avec une unique dose de vaccin chez cette population sauf dans la population immunodéprimée pour laquelle il était toujours recommandé d'administrer deux doses de vaccins dans un contexte de pénurie vaccinale.<sup>641</sup> D'un côté les données de la littérature montrent que les transplantés présentent de faibles taux d'immunisation après une vaccination, mais d'un autre côté la réponse humorale à l'infection semble satisfaisante. Le but de cette étude était de décrire les résultats de l'immunisation après une dose du vaccin Spikevax chez les transplantés rénaux qui étaient déjà séropositifs en raison d'une exposition antérieure au SARS-CoV-2.

### *2) Principaux points de méthodologies*

Les transplantés rénaux ayant une sérologie positive le jour de la 1<sup>ère</sup> dose de vaccin ont été inclus. La réponse sérologique a été évaluée un mois après la vaccination à l'aide du test ARCHITECT IgG II Quant (Abbott). Les titres > 7,1 BAU ont été considérés comme positifs (plage de détection : 1–11 267 BAU/mL). Nous avons également comparé cette réponse à celle de 22 employés du CHU de Strasbourg ayant des antécédents de COVID-19 qui ont reçu soit le vaccin Comirnaty (n = 19) soit le vaccin Spikevax (n = 3).

### *3) Principaux résultats*

Un total de 41 patients a été inclus. Parmi eux, 11 ont été diagnostiqués sur la base des résultats des tests sérologiques. Pour les 30 patients restants, une infection COVID-19 symptomatique

avait déjà été rapportée. L'intervalle médian entre l'infection et la vaccination était de 306 jours (EI : 171-316 jours). Au total, 22 patients étaient asymptomatiques ou avaient une maladie bénigne et ont été pris en charge à domicile. Dix-neuf patients ont été hospitalisés (13 avec un COVID-19 modéré et six avec une maladie critique/sévère). L'immunosuppression a été réduite chez 20 patients au cours du COVID-19. Cependant, elle a été réintroduite par la suite et tous les participants recevaient régulièrement leur traitement immunosuppresseur au moment de la vaccination. Le titre médian d'anticorps à l'inclusion était de 119 BAU/mL (EI : 35,1-314,6 BAU/mL), avec une augmentation significative après la vaccination (titre médian d'anticorps : 3211 BAU/mL ; EI : 1517-11 033 BAU/mL,  $p < 0,0001$ ). Après la vaccination, les transplantés qui avaient nécessité une hospitalisation avaient un titre d'anticorps plus élevé que ceux qui avaient été pris en charge à domicile (titre médian d'anticorps : 6976 BAU/mL contre 2019 BAU/mL, respectivement,  $p = 0,04$ ). Le titre d'anticorps des employés hospitaliers après une médiane de 19 jours (EI : 21 à 28 jours) après la vaccination n'a pas différé de manière significative (titre médian d'anticorps : 3830 BAU/mL ; EI : 1320 à 6018 BAU/mL,  $p = 0,34$ , figure 49) de celui observé chez les transplantés.

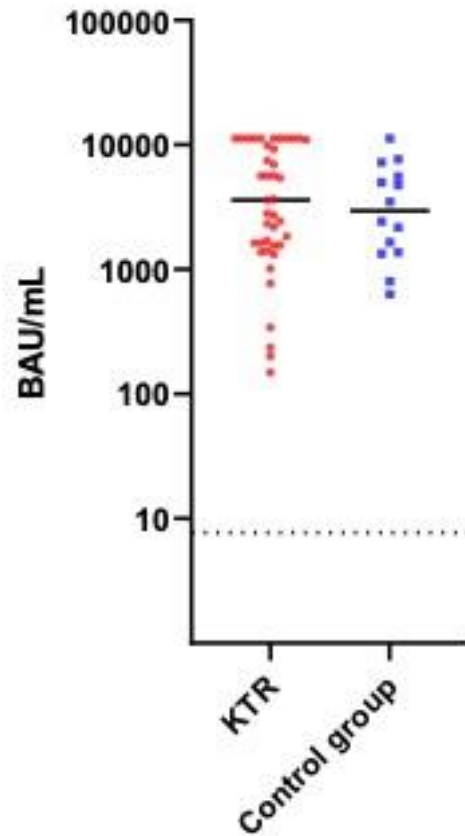


Figure 49. Titres d'anticorps anti-RBD IgG après une dose du vaccin ARNm

Comparaison entre les transplantés (n = 41 ; couleur rouge) et les employés hospitaliers (n = 22 ; couleur bleue). Les lignes noires indiquent les titres médians d'anticorps observés dans les deux groupes. La ligne en pointillés indique le seuil de séropositivité (7,1 BAU/mL).

La méthodologie, les résultats et la discussion détaillés du manuscrit concernant ces résultats sont présentés ci-dessous.

# Strong antibody response after a first dose of a SARS-CoV-2 mRNA-based vaccine in kidney transplant recipients with a previous history of COVID-19

## To the Editor:

A recent study demonstrated that a single dose of a severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) mRNA-based vaccine is sufficient to mount a robust immunological response in immunocompetent subjects with a previous history of coronavirus disease 2019 (COVID-19).<sup>1,2</sup> While research has suggested that immunocompromised kidney transplant recipients (KTRs) who received mRNA-based vaccines show low immunization rates,<sup>3-5</sup> the question as to whether this also applies to KTRs with a past history of COVID-19 remains unanswered. The aim of this study was to describe the results of immunization after one dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in KTRs who were already seropositive at baseline because of previous exposure to SARS-CoV-2.

All KTRs ( $n = 41$ ) tested positive for anti-SARS-CoV-2 antibodies on the day of vaccination. Of them, 11 were diagnosed by chance based on the results of serology testing. For the remaining 30 patients, the median interval between infection and vaccination was 306 days (interquartile range [IQR]: 171–316 days). The serological response was assessed after a median of 28 days (IQR: 28–31 days) from vaccination using the ARCHITECT IgG II Quant test (Abbott). Titers  $>50$  arbitrary units (AUs)/mL were considered positive (detection range: 6.8–80000 AUs/mL). This assay has been reported to correlate with in vitro neutralization of SARS-CoV-2.<sup>1</sup> The study protocol was approved by the local Ethics Committee (approval DC-2013-1990), and written informed consent was obtained.

KTRs were mainly men (74%) with a median age of 59 years (IQR: 51–66 years). Maintenance immunosuppression was based on the use of calcineurin inhibitors (95%), antimetabolites (86%), and steroids (57%). According to the WHO classification, 22 patients were asymptomatic or had mild disease and were managed at home. Nineteen patients were hospitalized (13 with moderate COVID-19 and six with critical/severe disease). Immunosuppression was reduced in 20 patients during the course of COVID-19. However, it was subsequently reintroduced and all of the participants were regularly receiving their immunosuppressive therapy at the time of vaccination.

The median baseline antibody titer was 842 AUs/mL (IQR: 249–2234 AUs/mL), with a significant postvaccination increase being evident (median antibody titer: 22801 AUs/mL; IQR: 10768–78339 AUs/mL,  $p < 0.0001$ ; Figure 1A). After vaccination,

KTRs who required hospitalization ( $n = 19$ ) had a higher antibody titer compared with those who were managed at home ( $n = 22$ ; median antibody titer: 49531 AUs/mL vs. 14334 AUs/mL, respectively,  $p = 0.04$ , Figure 1B). However, no significant differences in prevaccination antibody titers were observed between the two groups (median antibody titer: 842 vs. 958 AUs/mL, respectively,  $p = 0.7$ ). For comparison purposes, we also analyzed the antibody response of 22 health-care workers with a history of COVID-19 who received either the BNT162b2 ( $n = 19$ ) or the mRNA-1273 vaccine ( $n = 3$ ). This group mainly consisted of women (75%) with a median age of 47 years (IQR: 35–57 years). The antibody titer of health-care workers after a median of 19 days (IQR: 21–28 days) from vaccination did not differ significantly (median antibody titer: 27191 AUs/mL; IQR: 9370–42729 AUs/mL,  $p = 0.34$ , Figure 1C) from that observed in KTRs.

Despite their immunosuppression burden, KTRs with previous exposure to SARS-CoV-2 showed a marked increase in antibody titers even after a single-dose vaccine. Notably, the postvaccination antibody titers observed in these immunosuppressed patients were similar to those of immunocompetent subjects. A preexisting B cell memory in recovered individuals is likely to play a key role in this phenomenon<sup>2</sup>—which suggests that the immune response of KTRs to SARS-CoV-2 is similar to that observed in immunocompetent individuals. This response is strikingly different from that described for SARS-CoV-2-naïve KTRs who received SARS-CoV-2 mRNA-based vaccines.<sup>3-5</sup> An “antigen dose” phenomenon may account for these discrepancies.

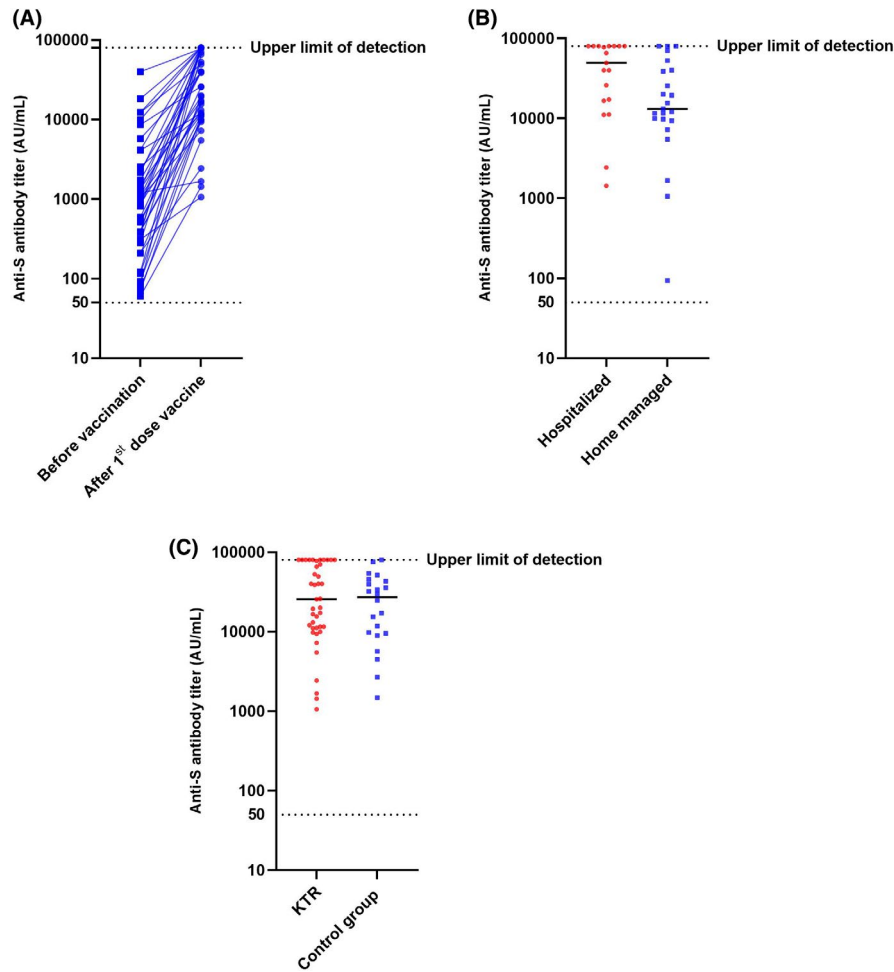
## DISCLOSURE

The authors of this manuscript have conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*. Dr Caillard reports personal fees and nonfinancial support from Novartis, nonfinancial support from Sanofi, and nonfinancial support from Astellas, unrelated to the current study. The other authors have no conflict of interest to disclose.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data supporting the findings from this study are available from the corresponding author upon reasonable request.





**FIGURE 1** (A) Kinetics of anti-Spike IgG antibody titers before and after one dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in 41 kidney transplant recipients (KTRs) who were already seropositive before vaccination. The dotted line (50 AUs/mL) denotes the cutoff for positivity. The blue lines indicate the antibody titers observed in each KTR. (B) Anti-Spike IgG antibody titers after one dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in hospitalized ( $n = 19$ ; red color) and home managed KTRs ( $n = 22$ ; blue color). The black lines denote the median antibody titers observed in the two groups. Antibody titer was significantly higher in hospitalized patients (median antibody titer: 49531 AUs/mL vs. 14334 AUs/mL, respectively,  $p = 0.04$ ). (C) Anti-Spike IgG antibody titers after one dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in KTRs ( $n = 41$ ; red color) and health-care workers ( $n = 22$ ; blue color). The black lines denote the median antibody titers observed in the two groups. The antibody titer of health-care workers and KTRs did not differ significantly (median antibody titer: 27191 AUs/mL vs. 22801 AUs/mL,  $p = 0.34$ ) [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

Ilies Benotmane<sup>1,2</sup>   
 Gabriela Gautier -Vargas<sup>1</sup>  
 Floriane Gallais<sup>2,3</sup>  
 Pierre Gantner<sup>2,3</sup>  
 Noëlle Cognard<sup>1</sup>   
 Jérôme Olagne<sup>1</sup>  
 Aurélie Velay<sup>2,3</sup>  
 Françoise Heibel<sup>1</sup>  
 Laura Braun-Parvez<sup>1</sup>  
 Jonas Martzloff<sup>1</sup>  
 Peggy Perrin<sup>1</sup>  
 Bruno Moulin<sup>1,2</sup>  
 Samira Fafi-Kremer<sup>2,3</sup>   
 Sophie Caillard<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Nephrology and Transplantation, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

<sup>2</sup>Inserm UMR S1109 Labex Transplantex, Fédération de Médecine Translationnelle, Strasbourg University, Strasbourg, France

<sup>3</sup>Department of Virology, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

#### Correspondence

Ilies Benotmane, Department of Nephrology and Transplantation, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France.

Email: [Ilies.benotmane@chru-strasbourg.fr](mailto:Ilies.benotmane@chru-strasbourg.fr)

**ORCID**

Ilies Benotmane  <https://orcid.org/0000-0001-9113-2479>

Noëlle Cognard  <https://orcid.org/0000-0001-6602-2059>

Samira Fafi-Kremer  <https://orcid.org/0000-0003-3886-7833>

**REFERENCES**

1. Predecki M, Clarke C, Brown J, et al. Effect of previous SARS-CoV-2 infection on humoral and T-cell responses to single-dose BNT162b2 vaccine. *The Lancet*. 2021;397(10280):1178-1181. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00502-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00502-X).
2. Goel RR, Apostolidis SA, Painter MM, et al. Distinct antibody and memory B cell responses in SARS-CoV-2 naïve and recovered individuals following mRNA vaccination. *Sci Immunol*. 2021;6(58):eabi6950. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abi6950>.
3. Benotmane I, Gautier-Vargas G, Cognard N, et al. Low immunization rates among kidney transplant recipients who received 2 doses of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *Kidney Int*. 2021;99(6):1498-1500. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2021.04.005>.
4. Benotmane I, Gautier-Vargas G, Cognard N, et al. Weak anti-SARS-CoV-2 antibody response after the first injection of an mRNA COVID-19 vaccine in kidney transplant recipients. *Kidney Int*. 2021;99(6):1487-1489. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2021.03.014>.
5. Boyarsky BJ, Werbel WA, Avery RK, et al. Antibody response to 2-dose SARS-CoV-2 mRNA vaccine series in solid organ transplant recipients. *JAMA*. 2021;325(21):2204. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.7489>.

## **C. Amélioration de la capacité de neutralisation du variant delta après une quatrième dose du vaccin Spikevax SARS-CoV-2 chez le transplanté rénal**

### *1) Rationnel et objectifs de l'étude*

Bien que la réponse anticorps après une vaccination anti-SARS-CoV-2 chez les sujets immunocompétents semble suffisante pour neutraliser le variant delta, l'efficacité semble être 3 à 5 fois inférieure à celle observée contre le variant alpha.<sup>515,535</sup> Par ailleurs, comme nous l'avons vu précédemment, les schémas vaccinaux standards sont en proie à une faible immunogénicité chez les sujets immunodéprimés. En juin 2021, les autorités sanitaires françaises ont approuvé la possibilité d'administrer une quatrième dose de vaccin aux transplantés d'organes solides qui avaient une faible réponse après une troisième dose. Le but de cette étude est de décrire la cinétique des anticorps neutralisants contre la souche delta avant et après une quatrième dose du vaccin Sipekevax chez des transplantés rénaux ayant montré une faible réponse anticorps après 3 doses précédentes. Nous avons également évalué la corrélation entre cette activité neutralisante et les titres d'anticorps anti-RBD. Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'institut Pasteur.

### *2) Principaux points de méthodologie*

Les patients avec une réponse sérologique faible (titre d'IgG < 143 BAU/mL.) un mois après la troisième dose étaient éligibles pour une quatrième injection de 100 µg de Spikevax. Les titres d'IgG anti-RBD ont été quantifiés à l'aide du kit sérologique ARCHITECT IgG II Quant (Abbott, Abbott Park, Illinois, États-Unis).

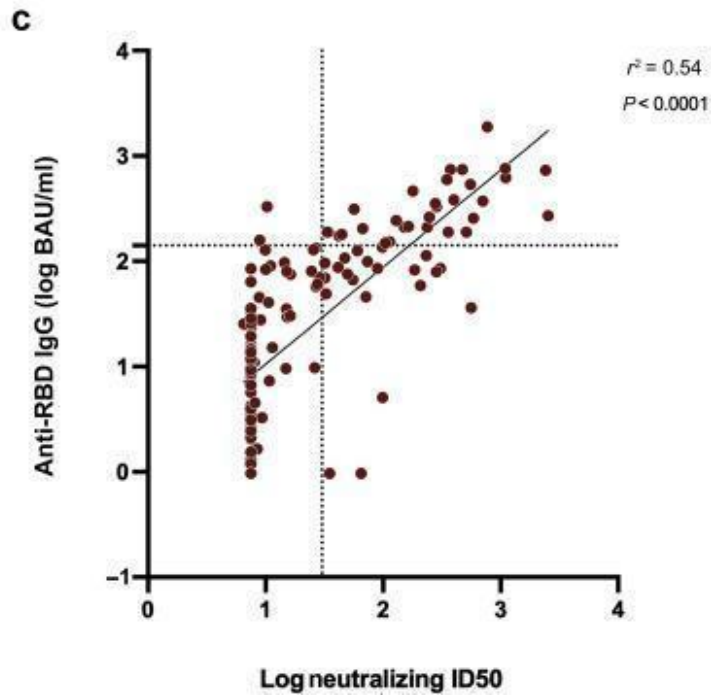
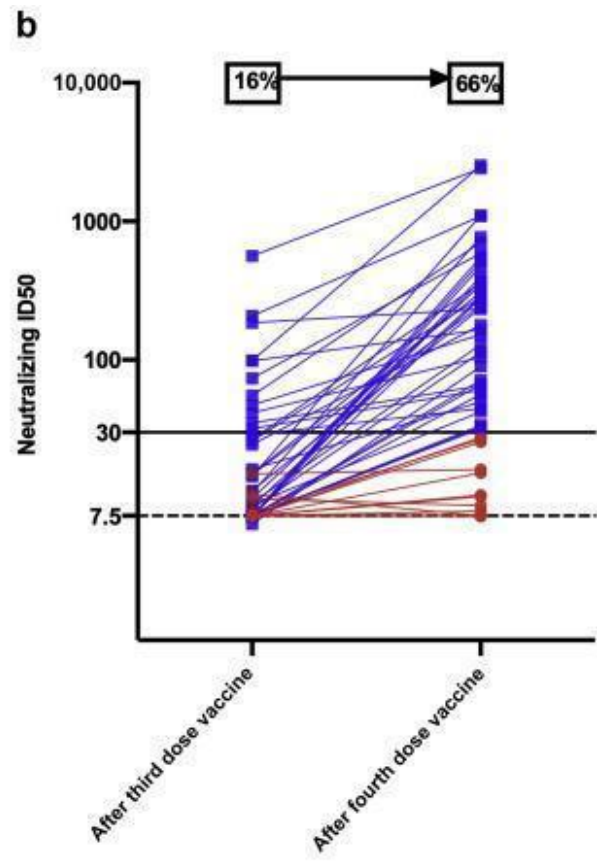
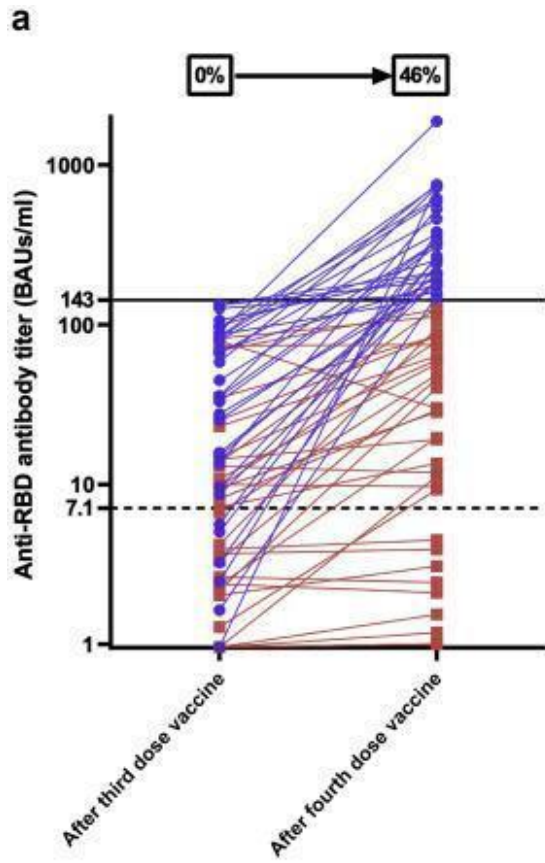
La neutralisation des virus vivants (souche delta) a été étudiée à l'aide d'une lignée cellulaire S-Fuse. Les cellules U2OS-ACE2 GFP1-10 et GFP-11, aussi appelées cellules S-Fuse étaient utilisées. Ces cellules expriment ACE2 et GFP1-10 ou GFP11. Lorsqu'elles fusionnent à la suite d'une infection par le SARS-CoV-2, elles expriment la protéine GFP (protéine

fluorescente verte). L'infection a été donc quantifiée en mesurant le nombre de cellules GFP+. Les cellules ont été mélangées (rapport 1 : 1) et ont été distribuées dans des puits à hauteur de  $8 \times 10^3$  cellules par puits dans une plaque  $\mu$ Clear à 96 puits (Greiner Bio-One). Les sérums ont été inactivés pendant 30 min à 56 °C avant utilisation. Les souches delta SARS-CoV-2 ont été incubées avec des sérums dilués en série durant 15 min à température ambiante et ajoutées aux cellules S-Fuse. Dix-huit heures plus tard, les cellules ont été fixées avec 2 % de paraformaldéhyde, lavées et colorées avec Hoechst (dilution 1 : 1000, Invitrogen). Les images ont été acquises avec un microscope confocal à haut contenu Opera Phenix (PerkinElmer). Les zones GFP+ ont été quantifiées à l'aide du logiciel Harmony (PerkinElmer). Le pourcentage de neutralisation a été calculé en utilisant le nombre de syncytia comme valeur avec la formule suivante :  $100 \times (1 - (\text{valeur 'avec sérum'} - \text{valeur en 'non-infecté'}) / (\text{valeur en 'sans sérum'} - \text{valeur en 'non-infecté'}))$ . L'activité neutralisante contre la souche delta a été exprimée comme la concentration capable d'inhiber 50 % de l'inoculum viral (dilution inhibitrice 50, DI50 ; limite de détection : 7,5). Une DI50 > 30 était considérée comme positive. Ce seuil a été utilisé car la dilution la plus faible utilisée pour ce test chez les individus immunocompétents est de 1 : 30 - résultant en un seuil de détection DI50 de 30. Afin d'améliorer la comparabilité, nous avons appliqué le même seuil à la population étudiée. Lors de l'analyse de patients immunodéprimés avec une faible réponse humorale, une dilution supplémentaire a été étudiée (1 : 7,5) pour identifier un titre DI50 neutralisant plus précis. Les titres d'IgG anti-RBD et l'ID50 neutralisant ont été quantifiés un mois après les troisième et quatrième doses de vaccin. Afin d'exclure une immunité naturelle, les titres d'IgG de la protéine N anti-SARSCoV-2 ont été mesurés un mois après la quatrième dose de vaccin.

### 3) *Principaux résultats*

Soixante-sept transplantés rénaux ayant une faible réponse humorale après 3 doses du vaccin Spikevax ont reçu une quatrième dose. L'intervalle médian entre la troisième et la quatrième

dose était de 68 jours (EI 63–82 jours). Après la quatrième dose, la médiane du titre anti-RBD a augmenté de manière significative ( $p < 0,0001$ ) de 13 BAU/ml (EI 2,6–66,3 BAU/ml) à 112,5 BAU/ml (EI 13,5–260 BAU/ml) (figure 50). En parallèle, les titres médians de DI50 ont augmenté significativement ( $p = 0,0001$ ) de  $< 7,5$  (EI  $< 7,5$ –15,1) à 47,1 (EI  $< 7,5$ –284,2). Seulement 16 % des patients ( $n = 11$ ) présentaient des anticorps neutralisants contre la souche delta avant la quatrième injection. Ce pourcentage est passé à 66 % ( $n = 44$ ) après la 4<sup>ème</sup> dose. Les patients avec des anticorps neutralisants indétectables après la troisième dose étaient moins susceptibles de voir augmenter leur capacité neutralisante après la quatrième dose (variation médiane d'un facteur 1,1 [EI 1–7,5] contre 6,3 [EI 2–15,9] ;  $p = 0,01$ ). Les patients sous tacrolimus, MMF et des stéroïdes ont affiché des titres DI50 neutralisants inférieurs (titres DI50 médians 25,6 contre 140,6 ;  $p = 0,01$ ). Les titres DI50 neutralisants contre le variant delta étaient positivement corrélés aux titres anti-RBD (Pearson  $r^2 = 0,54$  ;  $p < 0,0001$  ; figure 50). Pour des titres anti-RBD  $> 143$  BAU/ml après la quatrième dose, la spécificité, la sensibilité, la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative pour détecter une activité neutralisante étaient de 92,9 %, 74,3 %, 93,6 % et 72,2 %.



## Figure 50. Réponse post-quatrième dose du vaccin Spikevax

(a) Titres d'anticorps anti-RBD après les troisième et quatrième doses du vaccin Spikevax chez 67 transplantés rénaux. Un titre de  $> 7,1$  BAU/ml a été considéré comme positif (ligne pointillée), tandis qu'un titre de  $< 143$  BAU/ml a été considéré comme reflétant une faible réponse humorale (ligne noire). Les pourcentages de patients avec des titres supérieurs à 143 BAU/ml avant et après la quatrième dose sont indiqués dans le graphique. Les lignes bleues représentent les patients avec un titre  $> 143$  BAU/ml, tandis que les lignes rouges indiquent les patients avec un titre  $< 143$  BAU/ml après la quatrième dose. (b) Dilution inhibitrice neutralisante 50 (DI50) contre le variant delta après les troisième et quatrième doses du vaccin Spikevax chez 67 greffés rénaux (limite de détection 7,5 ; ligne pointillée). Une DI50 neutralisante  $> 30$  a été considérée comme positive (ligne noire). Les pourcentages de patients présentant une activité neutralisante contre le variant delta avant et après la quatrième dose sont indiqués dans le graphique. Les lignes bleues représentent les patients avec une DI50 neutralisante  $> 30$ , tandis que les lignes rouges indiquent les patients avec une DI50 neutralisante  $< 30$  après la quatrième dose. (c) Diagramme de dispersion et ligne de régression montrant une corrélation positive significative entre les titres d'anticorps anti-RBD (log BAU/ml) et le DI50 contre la souche delta (log ID50) avant et après la quatrième dose de Spikevax chez 67 greffés rénaux (Pearson  $r^2 = 0,54$  ;  $p < 0,0001$ ). La ligne pointillée parallèle à l'axe y représente le seuil pour un titre DI50 neutralisant positif (30), tandis que la ligne pointillée parallèle à l'axe x représente le seuil pour un titre d'anticorps IgG RBD faible (143 BAU/ml).

La méthodologie, les résultats et la discussion détaillés du manuscrit concernant ces résultats sont présentés ci-dessous.

# A fourth dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine improves serum neutralization against the Delta variant in kidney transplant recipients



Ilies Benotmane<sup>1</sup>, Timothée Bruel<sup>2,3</sup>, Delphine Planas<sup>2,3</sup>, Samira Fafi-Kremer<sup>4</sup>, Olivier Schwartz<sup>2,3</sup> and Sophie Caillard<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Nephrology and Transplantation, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France; <sup>2</sup>Institut Pasteur, Université de Paris, Centre national de la recherche scientifique (CNRS), Unité mixte de recherche (UMR) 3569, Virus and Immunity Unit, Paris, France; <sup>3</sup>Vaccine Research Institute, Basic Division, Créteil, France; and <sup>4</sup>Department of Virology, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

*Kidney International* (2022) **101**, 1073–1076; <https://doi.org/10.1016/j.kint.2022.02.011>

KEYWORDS: Delta variant; fourth dose; kidney transplantation; mRNA vaccine; neutralizing antibodies; SARS-CoV-2

Copyright © 2022, International Society of Nephrology. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Research has suggested that even 3 doses of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 mRNA-based vaccines might be unable to elicit a sufficient immune response in immunocompromised kidney transplant recipients.<sup>1,2</sup> Although the antibody response mounted by the Pfizer and AstraZeneca vaccines in immunocompetent subjects seems sufficient to neutralize the Delta variant,<sup>3</sup> the effectiveness appears 3- to 5-fold lower than that observed against the Alpha variant.<sup>4,5</sup> In addition, standard vaccination schemes are beset by low immunogenicity in immunocompromised subjects, who remain prone to develop severe coronavirus disease 2019 (COVID-19).<sup>3</sup> The purpose of this study is to describe the kinetics of the neutralizing antibody response against the Delta strain before and after a fourth dose of the mRNA-1273 (Moderna) vaccine in kidney transplant recipients who had experienced a weak antibody response after 3 previous doses. We also assessed the correlation between this neutralizing activity and levels of IgG against the receptor-binding domain (RBD) of the spike protein.

## RESULTS

Sixty-seven kidney transplant recipients (median age 56.6 years; interquartile range [IQR] 47–64.6 years;  $n = 41$  [61.2%] men) showed a weak humoral response after 3 doses of the mRNA-1273 vaccine and received a fourth dose (Supplementary Methods). None of these patients had a history of COVID-19 and displayed anti-nucleocapsid antibodies. The median interval from transplantation to the fourth dose was 6.1 years (IQR 2.2–11.4 years). As for immunosuppressive therapy, 97% of the study patients were being treated with calcineurin inhibitors, 82% with mycophenolate mofetil, 76% with steroids, and 18% with mammalian target of rapamycin inhibitors (Table 1). The median interval between the third and fourth doses was 68 days (IQR 63–82 days). After the fourth dose, the median anti-RBD titer increased significantly ( $P < 0.0001$ ) from 13 binding antibody units (BAUs)/ml (IQR 2.6–66.3 BAUs/ml) to 112.5 BAUs/ml (IQR 13.5–260 BAUs/ml) (Figure 1a). In parallel, median inhibitory dilution 50 (ID<sub>50</sub>) titers increased significantly ( $P = 0.0001$ ) from  $<7.5$  (IQR  $<7.5$ –15.1) to 47.1 (IQR  $<7.5$ –284.2). Although only 16% of patients ( $n = 11$ ) harbored neutralizing antibodies

**Correspondence:** Ilies Benotmane, Department of Nephrology and Transplantation, Strasbourg University Hospital, 1 place de l'hôpital, 67091 Strasbourg, France. E-mail: [ilies.benotmane@chru-strasbourg.fr](mailto:ilies.benotmane@chru-strasbourg.fr)

Received 3 December 2021; revised 30 January 2022; accepted 10 February 2022; published online 26 February 2022



**Table 1 | General characteristics of the study patients according to the neutralizing ID<sub>50</sub> titers after the fourth dose**

Characteristic	Entire cohort (N = 67)	Neutralizing ID <sub>50</sub> below 30 (n = 28)	Neutralizing ID <sub>50</sub> above 30 (n = 39)	P
Age, yr	56.6 (47–64.6)	53.1 (45–64.6)	57.6 (50.6–64.6)	0.29
Male sex	41 (61.2)	12 (42.9)	29 (74.4)	0.01
BMI, kg/m <sup>2</sup>	25.6 (22.3–29.6)	24.3 (22.2–28.9)	26.6 (22.7–29)	0.48
Comorbidities				
Cardiovascular disease	19 (28.4)	8 (28.5)	11 (28.2)	0.59
Diabetes	27 (39.3)	10 (35.7)	17 (43.6)	0.61
Hypertension	53 (79.1)	21 (75)	32 (82)	0.56
Time from kidney transplantation, yr	6.1 (2.2–11.4)	5.1 (1.8–11.1)	7.5 (2.5–11.3)	0.32
First transplantation	54 (80.6)	23 (82.1)	31 (79.5)	1
Deceased donor	55 (82.1)	22 (78.6)	33 (84.6)	0.54
CNI				0.2
Tacrolimus	51 (76.1)	24 (85.7)	27 (69.2)	
Cyclosporine	14 (20.9)	3 (10.7)	11 (28.2)	
No CNI	2 (3)	1 (3.6)	1 (2.6)	
MMF/MPA	55 (82)	24 (85.7)	31 (79.5)	0.74
mTOR inhibitors	12 (17.9)	4 (14.3)	8 (20.5)	0.74
Steroids	51 (76.1)	24 (85.7)	27 (69.2)	0.15
Tacrolimus + MMF/MPA + steroids	35 (52.2)	19 (67.9)	16 (41)	0.05
Serum creatinine (μmol/l)	132 (106.2–162.5)	131.3 (100.2–157.8)	132 (115.3–162.6)	0.61
History of graft rejection	15 (22.4)	12 (42.8)	3 (7.7)	0.002

BMI, body mass index; CNI, calcineurin inhibitor; ID<sub>50</sub>, inhibitory dilution 50; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; mTOR, mammalian target of rapamycin. Data are expressed as median (interquartile range) or n (%).

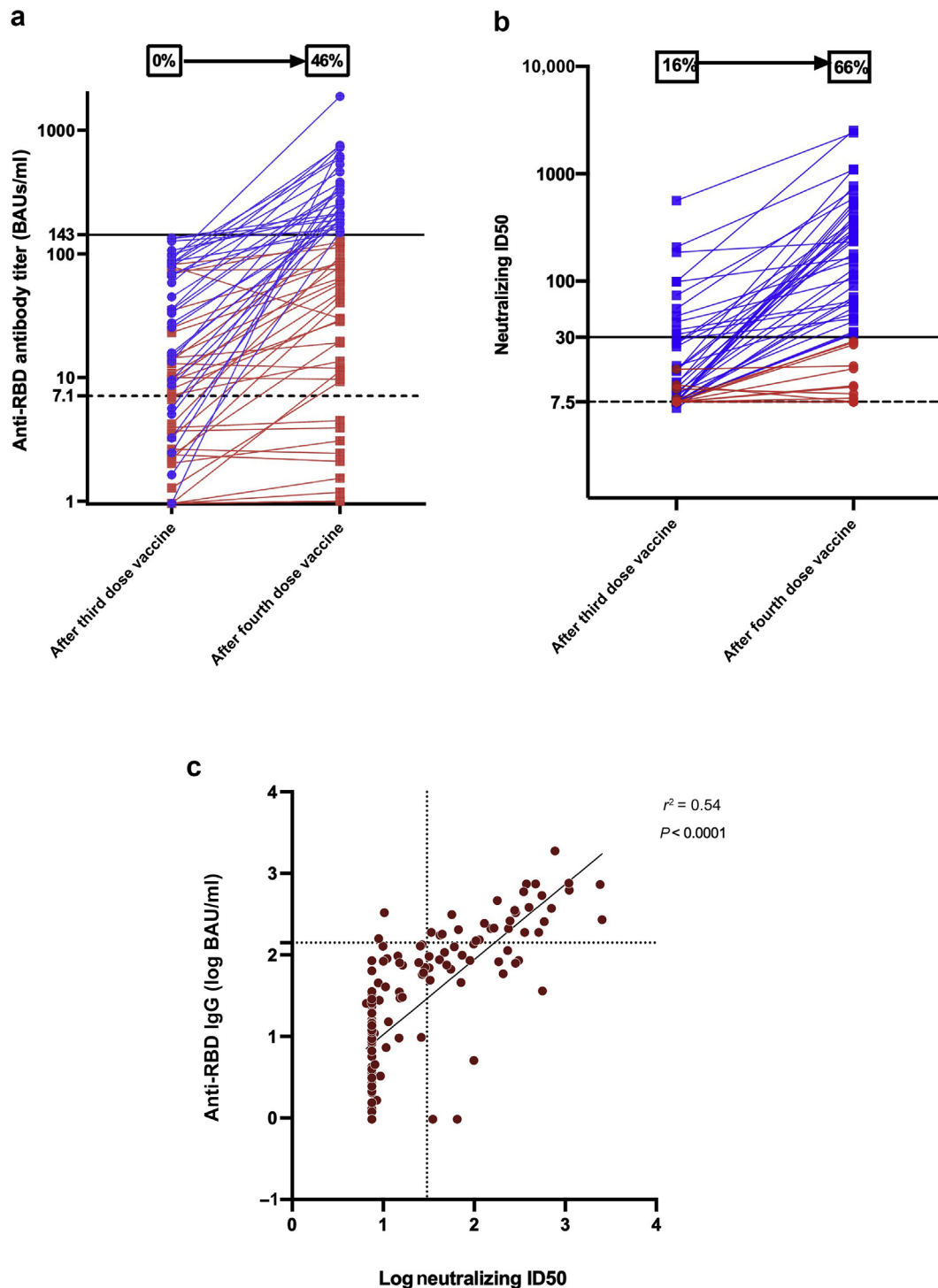
against the Delta strain before the fourth injection, this percentage raised to 66% (n = 44) afterward (Figure 1b). Patients with undetectable neutralizing antibodies after the third dose were less likely to have their neutralizing capacity increased after the fourth dose (median fold change 1.1 [IQR 1–7.5] vs. 6.3 [IQR 2–15.9]; P = 0.01). Of the 9 patients who were seronegative after the third dose, only 1 displayed a strong anti-RBD IgG response (>143 BAUs/ml) and 2 were able to neutralize the Delta variant after the fourth dose. Additionally, 81% of patients with a weak immune response after the third dose displayed a strong anti-RBD IgG response after the fourth injection. Notably, 63.8% of them were able to neutralize the Delta variant after the fourth dose. Interestingly, patients under combined therapy with tacrolimus, mycophenolate mofetil, and steroids displayed lower neutralizing ID<sub>50</sub> titers (median ID<sub>50</sub> titers 25.6 vs. 140.6; P = 0.01). Neutralizing ID<sub>50</sub> titers against the Delta variant were positively correlated with anti-RBD titers (Pearson r<sup>2</sup> = 0.54; P < 0.0001; Figure 1c). Once the anti-RBD titer exceeded 143 BAUs/ml after the fourth dose, the specificity, sensitivity, positive predictive value, and negative predictive value for detecting neutralizing activity were 92.9%, 74.3%, 93.6%, and 72.2%, respectively. Neither major adverse events nor graft rejections were observed after the fourth dose. One patient, who lacked neutralizing activity after the fourth injection (ID<sub>50</sub> titer <7.5), developed symptomatic COVID-19 caused by the Delta variant 19 days after receiving the fourth dose.

**DISCUSSION**

In this cohort of 67 kidney transplant recipients who showed a low immune response after 3 doses of the mRNA-1273 (Moderna) vaccine, a fourth dose significantly increased the neutralizing response against the Delta variant. Specifically, the proportion of patients harboring neutralizing antibodies

against the Delta strain rose significantly from 16% to 66%. In our study, men displayed higher neutralizing ID<sub>50</sub> titers than did women. Although this observation has no obvious pathophysiological explanations, it is in accordance with the results published by Masset *et al.*<sup>6</sup> after the third dose. Patients with a history of cellular or antibody-mediated rejection were less likely to display a neutralizing antibody response. This may be attributed to a higher burden of immunosuppression implemented in response to the rejection episodes. Only 2 published studies have focused on the effect of a fourth vaccine dose in patients who had undergone solid organ transplantation. In a small cohort of 18 solid organ transplant recipients, Alejo *et al.*<sup>7</sup> found that 8 patients with a negative or low response after the third dose developed high antibody titers after the fourth injection, a result in line with our current data.<sup>7</sup> Moreover, 6 of the 10 patients who already had high positive titers after 3 doses showed additional boosting after the fourth injection. This report did not provide data on the neutralizing activity, which has been shown to be highly predictive of immune protection against symptomatic severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection.<sup>8</sup> In another cohort of 37 patients, Kamar *et al.*<sup>9</sup> assessed antibody response, neutralizing activity, and T-cell response; a slight improvement of humoral response was observed. In the work by Kamar *et al.*,<sup>9</sup> 86% of the study patients (32 of 37) had no immune response after 3 doses. Conversely, 87% of our study participants (58 of 67) showed a weak antibody response after 3 doses. This may at least in part explain the discrepancies between the 2 investigations.

This is, to our knowledge, the first study to assess the effect of a fourth dose vaccine by taking into account the neutralizing activity against the Delta variant. Previous research has focused on the response of solid organ transplant recipients after a third vaccine dose.<sup>1,6</sup> Although improvements have



**Figure 1 | (a) Anti-receptor-binding domain (RBD) antibody titers after the third and fourth doses of the mRNA-1273 (Moderna) vaccine in 67 kidney transplant recipients.** A titer of  $>7.1$  binding antibody units (BAUs)/ml was regarded as positive (dotted line), whereas a titer of  $<143$  BAUs/ml was considered to reflect a weak humoral response (black line). The percentages of patients with titers above 143 BAUs/ml before and after the fourth dose are shown in the graph. Blue lines represent patients with a titer of  $>143$  BAUs/ml, whereas red lines denote patients with a titer of  $<143$  BAUs/ml after the fourth dose. **(b) Neutralizing inhibitory dilution 50 (ID<sub>50</sub>) against the Delta variant after the third and fourth doses of the mRNA-1273 (Moderna) vaccine in 67 kidney transplant recipients.** Neutralizing antibodies were expressed as the concentration capable of inhibiting 50% of the virus inoculum (ID<sub>50</sub>; limit of detection 7.5; dotted line). A neutralizing ID<sub>50</sub> of  $>30$  was considered as positive (black line). The percentages of patients showing neutralizing activity against the Delta variant before and after the fourth dose are shown in the graph. Blue lines represent patients with a neutralizing ID<sub>50</sub> of  $>30$ , whereas red lines denote patients with a neutralizing ID<sub>50</sub> of  $<30$  after the fourth dose. **(c) Scattergram and regression line showing a significant positive correlation between anti-RBD IgG antibody titers (log BAUs/ml) and neutralizing ID<sub>50</sub> against the Delta strain (log ID<sub>50</sub>) before and after the fourth dose of the mRNA-1273 (Moderna) vaccine in 67 kidney transplant recipients (Pearson  $r^2 = 0.54$ ;  $P < 0.0001$ ). The dotted line parallel to the y axis represents the cutoff for a positive neutralizing ID<sub>50</sub> titer (30), whereas the dotted line parallel to the x axis represents the cutoff for a weak RBD IgG antibody titer (143 BAUs/ml).**

been observed for both B- and T-cell responses, a significant proportion of nonresponders (30%–50%) was reported. In a double-blind, randomized, placebo-controlled trial of a third dose of mRNA-1273 vaccine, Hall *et al.*<sup>2</sup> found a higher neutralizing activity in the vaccine group versus the placebo group (median percent virus neutralization 71% vs. 25%, respectively). These observations suggest the existence of an “antigen dose effect,” indicating that stronger immune stimuli are required to improve vaccine immunogenicity. There have been previous reports of better immunogenicity after additional vaccine doses or higher vaccine dosing in immunocompromised patients.<sup>S1,S2</sup> Although a consensus threshold for COVID-19 seroprotection has not been defined yet, higher antibody titers have been correlated with a reduced risk of symptomatic infections.<sup>S3,S4</sup> These data, coupled with our findings, indicate that a fourth vaccine injection is beneficial in transplant recipients who show a weak response after 3 doses. It is nonetheless concerning that a fourth injection was still unable to elicit neutralizing antibodies against this variant in approximately one-third of our study sample. These patients should maintain strict sanitary protection measures and/or be considered as candidates for higher vaccine doses or prophylactic administration of monoclonal anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antibodies. Although immunosuppressive modulation during vaccination could be another alternative to improve vaccine response, this approach should be weighed against the risk of developing acute rejection. No data are currently available on the cost-effectiveness of this strategy.

In summary, our data indicate that a fourth mRNA-1273 vaccine injection in kidney transplant recipients with a

weak antibody response after 3 previous doses improves serum neutralization against the Delta variant.

#### DISCLOSURE

All the authors declared no competing interests.

#### SUPPLEMENTARY MATERIAL

[Supplementary File \(PDF\)](#)

[Supplementary Methods.](#)

[Supplementary References.](#)

#### REFERENCES

1. Benotmane I, Gautier G, Perrin P, et al. Antibody response after a third dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant recipients with minimal serologic response to 2 doses. *JAMA*. 2021;326:1063–1065.
2. Hall VG, Ferreira VH, Ku T, et al. Randomized trial of a third dose of mRNA-1273 vaccine in transplant recipients. *N Engl J Med*. 2021;385:1244–1246.
3. Subbaraman N. How do vaccinated people spread Delta? What the science says. Accessed September 14, 2021. <https://www.nature.com/articles/d41586-021-02187-1>
4. Planas D, Veyer D, Baidaliuk A, et al. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature*. 2021;596:276–280.
5. Lopez Bernal J, Andrews N, Gower C, et al. Effectiveness of Covid-19 vaccines against the B.1.617.2 (Delta) variant. *N Engl J Med*. 2021;385:585–594.
6. Masset C, Kerleau C, Garandeau C, et al. A third injection of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in kidney transplant recipients improves the humoral immune response. *Kidney Int*. 2021;100:1132–1135.
7. Alejo JL, Mitchell J, Chiang TPY, et al. Antibody response to a fourth dose of a SARS-CoV-2 vaccine in solid organ transplant recipients: a case series. *Transplantation*. 2021;105:e280–e281.
8. Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med*. 2021;27:1205–1211.
9. Kamar N, Abravanel F, Marion O, et al. Assessment of 4 doses of SARS-CoV-2 messenger RNA-based vaccine in recipients of a solid organ transplant. *JAMA Netw Open*. 2021;4:e2136030.

## Supplementary Methods

The serological response after the third vaccine dose was monitored in our entire kidney transplant cohort. Patients with a weak serological response one month after the third dose were eligible for a fourth injection of 100 µg of the mRNA-1273 (Moderna). Anti-SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain (RBD) IgG titers were measured with an ARCHITECT IgG II Quant test (Abbott, Abbott Park, IL, USA). Results in Arbitrary Units (AU)/mL specific of this assay were converted into Binding Antibody Units (BAUs)/mL adapted to the WHO standard for SARS-CoV-2 immunoglobulin by multiplying them by the factor 0.142 (assay range: 1–11360 BAUs/mL). The sequence used for RBD was from the WH-Human 1 coronavirus. In light of previous data showing that IgG titers >100 BAUs/mL (704 AUs/mL) were associated with the presence of neutralizing antibodies against the wild-type virus and its common variants (alpha, beta, and gamma),<sup>S5</sup> titers <100 BAUs/mL were considered to reflect a weak humoral response. We also considered titers between 100 BAUs/mL and 143 BAUs/mL (1000 AUs/mL) as weak, thus posing an indication for a fourth vaccine dose. This decision was motivated by the willingness to protect frail patients who displayed titers slightly above 100 BAUs/mL against COVID-19. Neutralization of live viruses (delta strain) was investigated using a reporter cell line (S-Fuse cells) as previously described.<sup>4</sup> Following SARS-CoV-2-induced formation of syncytia, a GFP signal proportional to virus infectivity is generated. The percentage of neutralization was calculated using the number of syncytia according to the following formula:  $100 \times (1 - (\text{value with serum} - \text{value in 'noninfected'}) / (\text{value in 'no serum'} - \text{value in 'noninfected'}))$ . Neutralizing activity against the delta strain was expressed as the concentration capable of inhibiting 50% of the virus inoculum (inhibitory dilution 50, ID50; limit of detection: 7.5). A neutralizing ID50>30 was considered as positive. This threshold was used since the lowest dilution used for this assay in immunocompetent individuals is generally 1:30 – resulting in an ID50

detection threshold of 30.<sup>4</sup> On analyzing immunocompromised patients with a weak humoral response, an additional dilution was studied (1:7.5) to identify a more precise neutralizing ID50 titer. In an effort to improve comparability, we applied the same threshold to the study population. Anti-RBD IgG and neutralizing ID50 were quantified one month after the third and fourth vaccine doses, respectively. In order to rule out natural immunity, anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid protein IgG titers were measured with an ARCHITECT SARS-CoV-2 IgG assay (Abbott) one month after the fourth vaccine dose. Continuous data are presented as medians and IQR and analyzed using the nonparametric Mann-Whitney *U* or Kruskal Wallis tests (for unmatched pairs) and the Wilcoxon signed rank tests (for matched pairs). Categorical variables are expressed as counts and percentages and compared using the Fisher's exact test. The Pearson's correlation coefficient ( $\rho$ ) was used to express the correlation between neutralizing ID50 and IgG levels against the RBD. All calculations were performed using GraphPad Prism, version 8.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). A two-sided P value < .05 was considered statistically significant. The study protocol was approved by the local Ethics Committee (identifier: DC-2013–1990) and written informed consent was obtained from all participants.

### **Supplementary References**

- S1. Natori Y, Shiotsuka M, Slomovic J, et al. A Double-Blind, Randomized Trial of High-Dose vs Standard-Dose Influenza Vaccine in Adult Solid-Organ Transplant Recipients. *Clin Infect Dis*. 2018;66(11):1698-1704. doi:10.1093/cid/cix1082
- S2. Pratt PK, Nunes D, Long MT, Farraye FA. Improved Antibody Response to Three Additional Hepatitis B Vaccine Doses Following Primary Vaccination Failure in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci*. 2019;64(7):2031-2038. doi:10.1007/s10620-019-05595-6
- S3. Feng S, Phillips DJ, White T, et al. Correlates of protection against symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med*. 2021;27(11):2032-2040. doi:10.1038/s41591-021-01540-1
- S4. Dimeglio C, Herin F, Miedougé M, Martin-Blondel G, Soulat JM, Izopet J. Protection of Healthcare Workers Against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Reinfection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2021;73(7):1323-1324. doi:10.1093/cid/ciab069
- S5. Gallais F, Gantner P, Bruel T, et al. Evolution of antibody responses up to 13 months after SARS-CoV-2 infection and risk of reinfection. *EBioMedicine*. 2021;71:103561. doi:10.1016/j.ebiom.2021.103561

## D. Discussion globale sur la vaccination

Dans ce travail, nous avons étudié la réponse humorale secondaire à l'administration d'un vaccin ARNm anti-SARS-CoV-2 (Spikevax) jusqu'à quatre doses dans une grande cohorte monocentrique de transplantés rénaux jusqu'à quatre doses. Le taux de séroconversion et l'ampleur de la réponse ont été analysés. Nous avons également étudié l'activité neutralisante après les 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> doses contre le variant delta (variant dominant au moment de l'étude) dans une partie de la cohorte. Nous avons analysé les principaux prédicteurs de la réponse humorale et de la cinétique des anticorps au fil du temps.

Sur les 562 patients qui ont été suivis après deux doses de vaccin, le taux de séropositivité n'était que de 46,6 % et la réponse anticorps était généralement faible. Ces résultats sont cohérents avec les données publiées montrant que les taux de séroconversion des transplantés d'organe solide qui ont reçu deux doses de vaccin à ARNm variaient de 30 % à 48 %.<sup>632,633,642,643</sup> Dans notre travail, nous avons trouvé qu'une troisième et une quatrième doses de vaccin administrées à des patients faiblement répondeurs améliorent la réponse vaccinale, permettant à environ 50% des séronégatifs d'obtenir une séroconversion à chaque dose. Dans la littérature, des doses supplémentaires de vaccins chez les transplantés améliorent les réponses humorale et cellulaire avec des taux de séroconversion similaire à nos résultats.<sup>636,644-647</sup>

Cette faible réponse vaccinale expose à un risque de COVID-19 potentiellement grave. Une enquête multicentrique du registre français décrit 55 patients greffés qui se sont présentés avec le COVID-19 après une médiane de 22 jours post-vaccination à 2 doses : 15 (27 %) ont nécessité une hospitalisation pour oxygénothérapie. Parmi eux, 6 ont été admis dans une unité de soins intensifs et 3 sont décédés.<sup>648</sup> Une étude tchèque portant sur 2101 greffés rénaux montre une réduction significative du COVID-19 chez les transplantés vaccinés (par rapport aux transplantés non vaccinés) mais l'incidence du COVID-19 chez les transplantés vaccinés reste plus élevée par rapport à la population générale.<sup>649</sup>

Pour cette raison, en plus de la séroconversion, nous nous sommes intéressés aux titres d'anticorps. Les patients avec des titres  $\geq 143$  BAU/mL étaient considérés comme bons répondeurs car ce seuil était corrélé à l'apparition d'anticorps neutralisants contre les principaux variant préoccupants au moment de l'étude (ère pré-delta) selon les données de notre laboratoire<sup>637</sup> et était associé à une protection vaccinale  $> 70\%$ .<sup>638,650</sup> Alors que le taux des bons répondeurs était passée de 22,2 % à 46,5 % après la troisième dose, plus de 50 % des participants de l'étude n'avaient toujours pas obtenu une protection considérée comme optimale. Lors de la campagne de vaccination pour la 4ème dose, qui a coïncidé avec l'émergence du variant delta caractérisé par un échappement à l'immunité naturelle et vaccinale, ce seuil de 143 BAU/mL était remis en question.<sup>515</sup> Nous nous sommes donc intéressés à l'activité neutralisante contre ce variant. La proportion de patients porteurs d'anticorps neutralisants contre la souche delta a significativement augmentée passant de 16 % à 66 %. Le seuil de 143 BAU/mL gardait une bonne valeur prédictive positive pour prédire la présence d'anticorps neutralisants. L'augmentation du taux de bons répondeurs après chaque dose de vaccin et la réponse satisfaisante observée chez les transplantés ayant des antécédents de COVID-19 (même après une seule administration) suggèrent un effet significatif de la dose d'antigène.

À l'inverse de la réponse humorale, la réponse cellulaire est plus fréquente après la vaccination des transplantés. Parmi quatorze études comprenant des données sur l'immunité des lymphocytes T, la plupart ont trouvé une meilleure réponse cellulaire T par rapport à la réponse humorale.<sup>651</sup> Une étude montre que la prévalence des transplantés avec des lymphocytes T réactifs aux protéines S détectables était comparable à celle des témoins sains mais l'ampleur de cette réponse reste moins importante.<sup>652</sup> Ces données suggèrent qu'une proportion de transplantés rénaux pourraient ne pas parvenir à une réponse humorale adéquate, mais pourraient développer des réponses cellulaires T réactives aux protéines S robustes. La présence



de cellules T anti-protéine S en l'absence d'anticorps spécifiques pourrait fournir un certain niveau de protection contre l'infection par le SARS-CoV-2 en limitant l'étendue de la réplication virale.

Dans notre cohorte, les traitements immunosuppresseurs, notamment par le bélatacept et les antimétabolites étaient indépendamment associés à une réponse humorale moins prononcée. Les taux résiduels élevés d'inhibiteurs de la calcineurine et des doses élevées de MMF/MPA avaient également un impact sur la réponse humorale spécifiquement en post 2<sup>ème</sup> dose. Dans la littérature, un taux de séroconversion aussi faible que 6 % a été décrit chez les transplantés traités par bélatacept.<sup>653-655</sup> Le bélatacept peut inhiber les lymphocytes T *helper* qui expriment CD28 de manière constitutive, les empêchant de fournir une aide aux cellules B et entraînant une réponse humorale défailante. Ce blocage de la co-stimulation perturbe aussi le lien entre les lymphocytes B et le T folliculaire *helper*, ce qui réduit la formation de centres germinatifs.<sup>7</sup>

De nombreuses études ont montré que l'utilisation d'antimétabolites réduit la réponse humorale à la vaccination de manière dose-dépendante chez les transplantés et les non transplantés.<sup>633,656,657</sup> L'effet antiprolifératif du MMF à forte dose peut entraver la réaction du centre germinatif et être ainsi à l'origine de l'absence de réponse post-vaccinale.<sup>658</sup> L'impact potentiel des inhibiteurs de la calcineurine reste controversé.<sup>633,659</sup>

Les comorbidités notamment l'âge, le délai de greffe et une fonction rénale réduite étaient également associées à une moindre réponse vaccinale. Ces données sont cohérentes avec celles rapportées dans la littérature.<sup>651</sup>

À partir de ces facteurs de risque de non-réponse, nous avons pu concevoir un score clinique simple pour prédire la réponse des transplantés rénaux après deux doses de vaccin. Lorsque le score était > 15, soixante-seize pour cent (76 %) de nos patients étaient incapables d'avoir une

protection humorale adéquate. Ainsi, cette échelle peut être utilisée pour identifier rapidement les transplantés rénaux qui nécessitent des stratégies de protection supplémentaires.

En plus des doses vaccinales supplémentaires, plusieurs stratégies ont été proposées pour augmenter l'efficacité des vaccins contre le SARS-CoV-2 chez les personnes immunodéprimées. La réduction transitoire de l'immunosuppression peut améliorer la réponse immunitaire à la vaccination, mais au prix d'un risque accru de rejet. Un essai clinique randomisé pour évaluer cette stratégie est en cours.<sup>660</sup> Dans une récente étude de 76 transplantés rénaux sans réponse sérologique après au moins trois vaccinations contre le COVID-19, le MMF/MPA a été suspendu chez 43 patients sélectionnés 5 à 7 jours avant la vaccination et pendant 4 semaines supplémentaires après la vaccination. La réponse vaccinale mesurée par une sérologie et les anticorps neutralisants était plus importante chez les patients ayant suspendu l'anti-métabolite. Chez ces patients, aucun épisode de rejet aigu n'est survenu pendant le suivi à court terme. Cependant, la résurgence d'anticorps anti-HLA antérieurs spécifiques au donneur a été détectée chez 7 patients.<sup>661</sup> Pour les patients sous bélatcept, le vaccin administré le plus à distance de la perfusion de bélatcept pourrait améliorer l'immunogénicité.<sup>662</sup> Le type de vaccin a également un impact sur la réponse vaccinale. Les vaccins à ARNm montrent un plus grand taux de séroconversion, notamment le vaccin Spikevax qui possède une dose d'antigène plus importante.<sup>651</sup> Quant à la vaccination hétérologue, celle-ci n'a montré un bénéfice que si le schéma initial ne comportait pas de vaccin à ARNm.<sup>663-665</sup>

La cinétique des anticorps a été évaluée à M3 après les deuxième et troisième doses et, dans un sous-groupe de patients, jusqu'à M6 après la deuxième dose. Les résultats ont révélé que les titres d'anticorps ont diminué d'environ 50 % à M3, puis ont encore diminué de 50 % entre M3 et M6. Dans une étude portant sur 312 patients chez qui la cinétique des anticorps a été évaluée à M3 et M6 après la deuxième dose, le taux de séropositivité à 6 mois est resté stable (61 %).

<sup>666,667</sup> Nos résultats sur la cinétique des anticorps après la troisième dose sont en accord avec ceux de Kamar *et al* qui ont trouvé des titres d'anticorps diminués à M3.<sup>668</sup> Cependant, ces résultats sont différents de ceux rapportés pour les transplantés ayant des antécédents de COVID-19, qui ont pu maintenir une réponse anticorps stable jusqu'à M6.

La baisse observée des anticorps chez les transplantés vaccinés appelle à proposer des doses de rappel soit en fonction des titres d'anticorps, soit à intervalles réguliers (par exemple, tous les trois à six mois).

# **Troisième partie :**

## **conclusions et**

## **perspectives**

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à deux infections virales dans une population immunodéprimée constituée de transplantés rénaux : une infection virale opportuniste chronique (BKPyV) qui cible essentiellement le transplanté rénal et peut conduire à la perte du greffon et une infection communautaire aiguë par le SARS-CoV-2 qui montre la vulnérabilité des immunodéprimés.

Notre étude sur le BKPyV apporte une preuve de concept sur l'intérêt des IgIV dans la réplication du BKPyV chez le transplanté rénal. Par un apport passif d'anticorps neutralisants via des IgIV, nous avons constaté une augmentation significative du titre d'anticorps neutralisants associée à une baisse de l'incidence de la virémie BKPyV et de la néphropathie à BKPyV chez des patients ayant de faibles taux d'anticorps neutralisants. Cependant, notre étude présente des limites par son design rétrospectif et le nombre relativement faible de patients. Pour cette raison, une étude prospective multicentrique randomisée dans le cadre d'un programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) national (BKANIG) menée par notre équipe vient de débiter. Le but de cette étude est de confirmer ces résultats. Les patients ayant un faible titre de NAb BKPyV contre la souche du donneur le jour de la greffe seront randomisés soit dans le groupe « traitement par IgIV » soit dans le groupe contrôle non traité. Les patients traités bénéficieront de trois perfusions d'IgIV à trois semaines d'intervalle à partir de J10 de la transplantation. La cinétique des NAb, l'incidence de la virémie et de la néphropathie à BKPyV seront étudiées et comparées entre les deux groupes.

Nos travaux sur le SARS-CoV-2 nous ont permis, tout d'abord, de caractériser le COVID-19 chez le transplanté rénal. L'analyse des données cliniques et biologiques des premiers patients transplantés rénaux atteints du COVID-19 nous a permis de montrer que les comorbidités sont associées à la sévérité de l'infection et à la mortalité liée à celle-ci chez le transplanté. Le syndrome de relargage cytokinique était à l'origine de la gravité de la maladie. Le suivi des

marqueurs de ce syndrome nous a permis de stratifier le risque d'évolution de nos patients vers les formes graves de COVID-19 et d'avoir une prise en charge plus personnalisée et adaptée à chaque patient. Nous avons également analysé les paramètres virologiques. Ceci nous a permis de constater qu'après une infection par le SARS-CoV-2, les transplantés rénaux avaient une charge virale élevée dans les voies respiratoires hautes sur une durée plus importante. L'étude à partir de cultures virales a montré la présence de virus viable à plus de 30 jours après le début des symptômes. Ceci a eu pour effet une durée d'isolement de nos patientes plus longue afin d'éviter la propagation du virus. L'autre conséquence possible est que cette excrétion virale prolongée favoriserait l'émergence des nouveaux variants. Avant la disponibilité de la vaccination, nous avons étudié la réponse sérologique post-infection de nos patients dans le but de savoir s'ils étaient protégés après un COVID-19. Cette réponse sérologique était satisfaisante et persistante jusqu'à au moins 6 mois après l'infection.

Enfin, nous nous sommes intéressés à la réponse vaccinale anti-SARS-CoV-2 dans une large cohorte monocentrique. Nous avons constaté que malgré quatre doses de vaccins, la réponse humorale restait insuffisante. Les comorbidités et l'immunosuppression sont les principaux facteurs de mauvaise réponse. Nous avons développé un score qui permet d'aider à la prédiction de la réponse vaccinale.

Notre travail sur les transplantés rénaux et le COVID-19 s'est poursuivi au-delà de cette thèse. Nous nous intéressons aux anticorps monoclonaux spécifique du SARS-CoV-2 utilisés en tant que thérapie prophylactique en pré-exposition et en curatif. Ces préparations sont utilisées chez les transplantés à risque de formes sévères de COVID-19 et non-répondeurs à la vaccination. Depuis l'émergence du variant omicron, l'Evusheld est utilisé. Nous étudions son efficacité clinique et virologique, sa cinétique et les éventuels effets délétères. Certains de ces travaux se sont déjà concrétisés et d'autres sont en cours d'achèvement.

## Références

1. Kalil AC, Opal SM. Sepsis in the Severely Immunocompromised Patient. *Curr Infect Dis Rep.* 2015;17(6):32.
2. Annual Data Report. USRDS.
3. Fishman JA. Infection in Solid-Organ Transplant Recipients. *N Engl J Med.* 2007;357(25):2601-2614.
4. Cordero E, Manuel O. Influenza vaccination in solid-organ transplant recipients. *Curr Opin Organ Transplant.* 2012;17(6):601-608.
5. Kumar D, Ferreira VH, Blumberg E, et al. A 5-Year Prospective Multicenter Evaluation of Influenza Infection in Transplant Recipients. *Clin Infect Dis.* 2018;67(9):1322-1329.
6. Günther M, Stark K, Neuhaus R, Reinke P, Schröder K, Bienzle U. Rapid decline of antibodies after hepatitis A immunization in liver and renal transplant recipients. *Transplantation.* 2001;71(3):477-479.
7. Babel N, Hugo C, Westhoff TH. Vaccination in patients with kidney failure: lessons from COVID-19. *Nat Rev Nephrol.* Published online August 23, 2022:1-16.
8. Gross L. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N.* 1953;83(2):414-421.
9. Stewart SE, Eddy BE, Gochenour AM, Borgese NG, Grubbs GE. The induction of neoplasms with a substance released from mouse tumors by tissue culture. *Virology.* 1957;3(2):380-400.
10. Buck CB, Doorslaer KV, Peretti A, et al. The Ancient Evolutionary History of Polyomaviruses. *PLOS Pathog.* 2016;12(4):e1005574.
11. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet Lond Engl.* 1971;1(7712):1257-1260.
12. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet Lond Engl.* 1971;1(7712):1253-1257.
13. Fauquet CM, Mayo MA. The 7th ICTV Report. *Arch Virol.* 2001;146(1):189-194.
14. Peretti A, FitzGerald PC, Bliskovsky V, Pastrana DV, Buck CB. Genome Sequence of a Fish-Associated Polyomavirus, Black Sea Bass (*Centropristis striata*) Polyomavirus 1. *Genome Announc.* 2015;3(1):e01476-14.
15. Ambalathingal GR, Francis RS, Smyth MJ, Smith C, Khanna R. BK Polyomavirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Therapies. *Clin Microbiol Rev.*

2017;30(2):503-528.

16. Hurdiss DL, Morgan EL, Thompson RF, et al. New Structural Insights into the Genome and Minor Capsid Proteins of BK Polyomavirus using Cryo-Electron Microscopy. *Struct Lond Engl* 1993. 2016;24(4):528-536.
17. Wu C, Randhawa P, McCauley J. Transplantation: Polyomavirus Nephropathy and the Risk of Specific Immunosuppression Regimens. *ScientificWorldJournal*. 2006;6:412-528.
18. Helle F, Brochot E, Handala L, et al. Biology of the BKPyV: An Update. *Viruses*. 2017;9(11):327.
19. Fang CY, Chen HY, Wang M, et al. Global analysis of modifications of the human BK virus structural proteins by LC-MS/MS. *Virology*. 2010;402(1):164-176.
20. Olsen GH, Hirsch HH, Rinaldo CH. Functional analysis of polyomavirus BK non-coding control region quasispecies from kidney transplant recipients. *J Med Virol*. 2009;81(11):1959-1967.
21. -Cubitt CL. Molecular genetics of the BK virus. *Adv Exp Med Biol*. 2006;577:85-95.
22. Broekema NM, Imperiale MJ. Efficient propagation of archetype BK and JC polyomaviruses. *Virology*. 2012;422(2):235-241.
23. Moens U, Van Ghelue M. Polymorphism in the genome of non-passaged human polyomavirus BK: implications for cell tropism and the pathological role of the virus. *Virology*. 2005;331(2):209-231.
24. Markowitz RB, Tolbert S, Dynan WS. Promoter evolution in BK virus: functional elements are created at sequence junctions. *J Virol*. Published online May 1990.
25. Bethge T, Hachemi HA, Manzetti J, Gosert R, Schaffner W, Hirsch HH. Sp1 sites in the noncoding control region of BK polyomavirus are key regulators of bidirectional viral early and late gene expression. *J Virol*. 2015;89(6):3396-3411.
26. Yogo Y, Zhong S, Xu Y, et al. Conserved archetypal configuration of the transcriptional control region during the course of BK polyomavirus evolution. *J Gen Virol*. 89(8):1849-1856.
27. Gosert R, Rinaldo CH, Funk GA, et al. Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *J Exp Med*. 2008;205(4):841-852.
28. Subpopulations of non-coding control region variants within a cell culture-passaged stock of BK virus: sequence comparisons and biological characteristics | Microbiology Society.
29. Broekema NM, Imperiale MJ. miRNA regulation of BK polyomavirus replication during early infection. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(20):8200-8205.
30. Tian YC, Li YJ, Chen HC, et al. Polyomavirus BK-encoded microRNA suppresses



autoregulation of viral replication. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;447(3):543-549.

31. An P, Sáenz Robles MT, Pipas JM. Large T antigens of polyomaviruses: amazing molecular machines. *Annu Rev Microbiol*. 2012;66:213-236.
32. Harris KF, Christensen JB, Radany EH, Imperiale MJ. Novel mechanisms of E2F induction by BK virus large-T antigen: requirement of both the pRb-binding and the J domains. *Mol Cell Biol*. 1998;18(3):1746-1756.
33. Harris KF, Christensen JB, Imperiale MJ. BK virus large T antigen: interactions with the retinoblastoma family of tumor suppressor proteins and effects on cellular growth control. *J Virol*. 1996;70(4):2378-2386.
34. Shivakumar CV, Das GC. Interaction of human polyomavirus BK with the tumor-suppressor protein p53. *Oncogene*. 1996;13(2):323-332.
35. Wang W, Simmons DT. Simian virus 40 large T antigen can specifically unwind the central palindrome at the origin of DNA replication. *J Virol*. 2009;83(7):3312-3322.
36. Mastrangelo IA, Hough PV, Wall JS, Dodson M, Dean FB, Hurwitz J. ATP-dependent assembly of double hexamers of SV40 T antigen at the viral origin of DNA replication. *Nature*. 1989;338(6217):658-662.
37. Cicala C, Avantaggiati ML, Graessmann A, Rundell K, Levine AS, Carbone M. Simian virus 40 small-t antigen stimulates viral DNA replication in permissive monkey cells. *J Virol*. 1994;68(5):3138-3144.
38. Howe AK, Gaillard S, Bennett JS, Rundell K. Cell cycle progression in monkey cells expressing simian virus 40 small t antigen from adenovirus vectors. *J Virol*. 1998;72(12):9637-9644.
39. Whalen B, Laffin J, Friedrich TD, Lehman JM. SV40 small T antigen enhances progression to >G2 during lytic infection. *Exp Cell Res*. 1999;251(1):121-127.
40. Good PJ, Welch RC, Ryu WS, Mertz JE. The late spliced 19S and 16S RNAs of simian virus 40 can be synthesized from a common pool of transcripts. *J Virol*. 1988;62(2):563-571.
41. Teunissen EA, de Raad M, Mastrobattista E. Production and biomedical applications of virus-like particles derived from polyomaviruses. *J Controlled Release*. 2013;172(1):305-321.
42. Liddington RC, Yan Y, Moulai J, Sahli R, Benjamin TL, Harrison SC. Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature*. 1991;354(6351):278-284.
43. Furmaga J, Kowalczyk M, Zapolski T, et al. BK Polyomavirus—Biology, Genomic Variation and Diagnosis. *Viruses*. 2021;13(8):1502.
44. Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1 - PubMed.

45. Ou WC, Hseu TH, Wang M, Chang H, Chang D. Identification of a DNA encapsidation sequence for human polyomavirus pseudovirion formation. *J Med Virol.* 2001;64(3):366-373.
46. Mannová P, Liebl D, Krauzewicz N, et al. Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *J Gen Virol.* 2002;83(Pt 9):2309-2319.
47. Nakanishi A, Itoh N, Li PP, Handa H, Liddington RC, Kasamatsu H. Minor capsid proteins of simian virus 40 are dispensable for nucleocapsid assembly and cell entry but are required for nuclear entry of the viral genome. *J Virol.* 2007;81(8):3778-3785.
48. Henriksen S, Hansen T, Bruun JA, Rinaldo CH. The Presumed Polyomavirus Viroprotein VP4 of Simian Virus 40 or Human BK Polyomavirus Is Not Required for Viral Progeny Release. *J Virol.* 2016;90(22):10398-10413.
49. Rinaldo CH, Traavik T, Hey A. The agnogene of the human polyomavirus BK is expressed. *J Virol.* 1998;72(7):6233-6236.
50. Johannessen M, Myhre MR, Dragset M, Tümmler C, Moens U. Phosphorylation of human polyomavirus BK agnoprotein at Ser-11 is mediated by PKC and has an important regulative function. *Virology.* 2008;379(1):97-109.
51. Myhre MR, Olsen GH, Gosert R, Hirsch HH, Rinaldo CH. Clinical polyomavirus BK variants with agnogene deletion are non-functional but rescued by trans-complementation. *Virology.* 2010;398(1):12-20.
52. Chatterjee M, Weyandt TB, Frisque RJ. Identification of archetype and rearranged forms of BK virus in leukocytes from healthy individuals. *J Med Virol.* 2000;60(3):353-362.
53. Groux-Degroote S, Guérardel Y, Delannoy P. Gangliosides: Structures, Biosynthesis, Analysis, and Roles in Cancer. *ChemBiochem Eur J Chem Biol.* 2017;18(13):1146-1154.
54. Neu U, Allen SAA, Blaum BS, et al. A structure-guided mutation in the major capsid protein retargets BK polyomavirus. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003688.
55. Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale MJ. Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J Virol.* 2006;80(3):1361-1366.
56. Moriyama T, Marquez JP, Wakatsuki T, Sorokin A. Caveolar Endocytosis Is Critical for BK Virus Infection of Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells. *J Virol.* 2007;81(16):8552-8562.
57. Zhao L, Marciano AT, Rivet CR, Imperiale MJ. Caveolin- and clathrin-independent entry of BKPyV into primary human proximal tubule epithelial cells. *Virology.* 2016;492:66-72.
58. Cripe TP, Delos SE, Estes PA, Garcea RL. In vivo and in vitro association of hsc70 with polyomavirus capsid proteins. *J Virol.* 1995;69(12):7807-7813.
59. Bennett SM, Zhao L, Bosard C, Imperiale MJ. Role of a nuclear localization signal on

the minor capsid proteins VP2 and VP3 in BKPyV nuclear entry. *Virology*. 2015;474:110-116.

60. 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(11):1383-1392.

61. Goudsmit J, Wertheim-van Dillen P, van Strien A, van der Noordaa J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J Med Virol*. 1982;10(2):91-99.

62. Sundsfjord A, Spein AR, Lucht E, Flaegstad T, Seternes OM, Traavik T. Detection of BK virus DNA in nasopharyngeal aspirates from children with respiratory infections but not in saliva from immunodeficient and immunocompetent adult patients. *J Clin Microbiol*. 1994;32(5):1390-1394.

63. Bofill-Mas S, Pina S, Girones R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(1):238-245.

64. Bofill-Mas S, Formiga-Cruz M, Clemente-Casares P, Calafell F, Girones R. Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. *J Virol*. 2001;75(21):10290-10299.

65. Taguchi F, Nagaki D, Saito M, Haruyama C, Iwasaki K. Transplacental transmission of BK virus in human. *Jpn J Microbiol*. 1975;19(5):395-398.

66. Boldorini R, Allegrini S, Miglio U, et al. BK virus sequences in specimens from aborted fetuses. *J Med Virol*. 2010;82(12):2127-2132.

67. Schmitt C, Raggub L, Linnenweber-Held S, Adams O, Schwarz A, Heim A. Donor origin of BKV replication after kidney transplantation. *J Clin Virol*. 2014;59(2):120-125.

68. BK polyomavirus: emerging pathogen - ScienceDirect.

69. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis*. 2009;199(6):837-846.

70. Zhong S, Zheng HY, Suzuki M, et al. Age-Related Urinary Excretion of BK Polyomavirus by Nonimmunocompromised Individuals. *J Clin Microbiol*. 2007;45(1):193-198.

71. Husseiny MI, Anastasi B, Singer J, Lacey SF. A comparative study of Merkel cell, BK and JC polyomavirus infections in renal transplant recipients and healthy subjects. *J Clin Virol*. 2010;49(2):137-140.

72. Stolt A, Sasnauskas K, Koskela P, Lehtinen M, Dillner J. Seroepidemiology of the human polyomaviruses. *J Gen Virol*. 2003;84(Pt 6):1499-1504.

73. Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. Seroepidemiology of Human Polyomaviruses.

*PLOS Pathog.* 2009;5(3):e1000363.

74. Knowles WA, Pipkin P, Andrews N, et al. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40. *J Med Virol.* 2003;71(1):115-123.
75. Jin L, Gibson PE, Booth JC, Clewley JP. Genomic typing of BK virus in clinical specimens by direct sequencing of polymerase chain reaction products. *J Med Virol.* 1993;41(1):11-17.
76. Tremolada S, Delbue S, Larocca S, et al. Polymorphisms of the BK virus subtypes and their influence on viral in vitro growth efficiency. *Virus Res.* 2010;149(2):190-196.
77. Luo C, Bueno M, Kant J, Martinson J, Randhawa P. Genotyping schemes for polyomavirus BK, using gene-specific phylogenetic trees and single nucleotide polymorphism analysis. *J Virol.* 2009;83(5):2285-2297.
78. Yogo Y, Sugimoto C, Zhong S, Homma Y. Evolution of the BK polyomavirus: epidemiological, anthropological and clinical implications. *Rev Med Virol.* 2009;19(4):185-199.
79. Zheng HY, Nishimoto Y, Chen Q, et al. Relationships between BK virus lineages and human populations. *Microbes Infect.* 2007;9(2):204-213.
80. Luo C, Hirsch HH, Kant J, Randhawa P. VP-1 quasispecies in human infection with polyomavirus BK. *J Med Virol.* 2012;84(1):152-161.
81. Zhong S, Randhawa PS, Ikegaya H, et al. Distribution patterns of BK polyomavirus (BKV) subtypes and subgroups in American, European and Asian populations suggest co-migration of BKV and the human race. *J Gen Virol.* 2009;90(Pt 1):144-152.
82. Pastrana DV, Ray U, Magaldi TG, Schowalter RM, Çuburu N, Buck CB. BK Polyomavirus Genotypes Represent Distinct Serotypes with Distinct Entry Tropism. *J Virol.* 2013;87(18):10105-10113.
83. Varella RB, Zalona ACJ, Diaz NC, Zalis MG, Santoro-Lopes G. BK polyomavirus genotypes Ia and Ib1 exhibit different biological properties in renal transplant recipients. *Virus Res.* 2018;243:65-68.
84. Schwarz A, Linnenweber-Held S, Heim A, Framke T, Haller H, Schmitt C. Viral Origin, Clinical Course, and Renal Outcomes in Patients With BK Virus Infection After Living-Donor Renal Transplantation. *Transplantation.* 2016;100(4):844-853.
85. Muñoz-Gallego I, Díaz-Madridano N, Moral N, et al. Detection of BK polyomavirus genotypes to predict the development of BK polyomavirus-associated complications in kidney transplant recipients: A retrospective analysis. *Transpl Infect Dis.* 2021;23(4):e13615.
86. Boukoum H, Nahdi I, Sahtout W, Skhiri H, Segondy M, Aouni M. BK polyomavirus

genotypes and nephropathy: is there a relationship? *Transpl Infect Dis.* 2016;18(2):309-311.

87. Dugan AS, Maginnis MS, Jordan JA, et al. Human  $\alpha$ -Defensins Inhibit BK Virus Infection by Aggregating Virions and Blocking Binding to Host Cells \*. *J Biol Chem.* 2008;283(45):31125-31132.

88. Abend JR, Low JA, Imperiale MJ. Inhibitory Effect of Gamma Interferon on BK Virus Gene Expression and Replication. *J Virol.* 2007;81(1):272-279.

89. Abend JR, Low JA, Imperiale MJ. Global effects of BKV infection on gene expression in human primary kidney epithelial cells. *Virology.* 2010;397(1):73-79.

90. Trydzenskaya H, Juerchott K, Lachmann N, et al. The genetic predisposition of natural killer cell to BK virus-associated nephropathy in renal transplant patients. *Kidney Int.* 2013;84(2):359-365.

91. Womer KL, Huang Y, Herren H, et al. Dendritic Cell Deficiency Associated With Development of BK Viremia and Nephropathy in Renal Transplant Recipients. *Transplantation.* 2010;89(1):115-123.

92. Yapici Ü, Kers J, Slavujevic-Letic I, et al. Intra-graft Blood Dendritic Cell Antigen-1–Positive Myeloid Dendritic Cells Increase during BK Polyomavirus–Associated Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(8):2502-2510.

93. Drake DR, Moser JM, Hadley A, et al. Polyomavirus-infected dendritic cells induce antiviral CD8(+) T lymphocytes. *J Virol.* 2000;74(9):4093-4101.

94. Drake DR, Shawver ML, Hadley A, Butz E, Maliszewski C, Lukacher AE. Induction of polyomavirus-specific CD8(+) T lymphocytes by distinct dendritic cell subpopulations. *J Virol.* 2001;75(1):544-547.

95. Ribeiro A, Wörnle M, Motamedi N, et al. Activation of innate immune defense mechanisms contributes to polyomavirus BK-associated nephropathy. *Kidney Int.* 2012;81(1):100-111.

96. Jiang M, Entezami P, Gamez M, Stamminger T, Imperiale MJ. Functional Reorganization of Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies during BK Virus Infection. *mBio.* 2011;2(1):e00281-10.

97. Manzetti J, Weissbach FH, Graf FE, et al. BK Polyomavirus Evades Innate Immune Sensing by Disrupting the Mitochondrial Network and Promotes Mitophagy. *iScience.* 2020;23(7):101257.

98. Bauman Y, Nachmani D, Vitenshtein A, et al. An Identical miRNA of the Human JC and BK Polyoma Viruses Targets the Stress-Induced Ligand ULBP3 to Escape Immune Elimination. *Cell Host Microbe.* 2011;9(2):93-102.

99. Schmidt T, Adam C, Hirsch HH, et al. BK polyomavirus-specific cellular immune

responses are age-dependent and strongly correlate with phases of virus replication. *Am J Transplant*. 2014;14(6):1334-1345.

100. Mutlu E, Köksoy S, Mutlu D, et al. Quantitative analysis of BKV-specific CD4+ T cells before and after kidney transplantation. *Transpl Immunol*. 2015;33(1):20-26.

101. Schachtner T, Müller K, Stein M, et al. BK virus-specific immunity kinetics: a predictor of recovery from polyomavirus BK-associated nephropathy. *Am J Transplant*. 2011;11(11):2443-2452.

102. Chen Y, Trofe J, Gordon J, et al. Interplay of cellular and humoral immune responses against BK virus in kidney transplant recipients with polyomavirus nephropathy. *J Virol*. 2006;80(7):3495-3505.

103. Hammer MH, Brestrich G, Andree H, et al. HLA type-independent method to monitor polyoma BK virus-specific CD4 and CD8 T-cell immunity. *Am J Transplant*. 2006;6(3):625-631.

104. Binggeli S, Egli A, Schaub S, et al. Polyomavirus BK-specific cellular immune response to VP1 and large T-antigen in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2007;7(5):1131-1139.

105. Binggeli S, Egli A, Dickenmann M, Binet I, Steiger J, Hirsch HH. BKV replication and cellular immune responses in renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2006;6(9):2218-2219; author reply 2220.

106. -Schaenman JM, Korin Y, Sidwell T, et al. Increased Frequency of BK Virus-Specific Polyfunctional CD8+ T Cells Predict Successful Control of BK Viremia after Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2017;101(6):1479-1487.

107. Randhawa PS, Popescu I, Macedo C, et al. Detection of CD8+ T cells sensitized to BK virus large T antigen in healthy volunteers and kidney transplant recipients. *Hum Immunol*. 2006;67(4-5):298-302.

108. Schneidawind D, Schmitt A, Wiesneth M, et al. Polyomavirus BK-specific CD8+ T cell responses in patients after allogeneic stem cell transplant. *Leuk Lymphoma*. 2010;51(6):1055-1062.

109. Mueller K, Schachtner T, Sattler A, et al. BK-VP3 as a new target of cellular immunity in BK virus infection. *Transplantation*. 2011;91(1):100-107.

110. Zhou W, Sharma M, Martinez J, et al. Functional characterization of BK virus-specific CD4+ T cells with cytotoxic potential in seropositive adults. *Viral Immunol*. 2007;20(3):379-388.

111. Leuenberger D, Andresen PA, Gosert R, et al. Human polyomavirus type 1 (BK virus) agnoprotein is abundantly expressed but immunologically ignored. *Clin Vaccine Immunol CVI*. 2007;14(8):959-968.

112. Krymskaya L, Sharma MC, Martinez J, et al. Cross-reactivity of T lymphocytes recognizing a human cytotoxic T-lymphocyte epitope within BK and JC virus VP1 polypeptides. *J Virol*. 2005;79(17):11170-11178.
113. Blyth E, Clancy L, Simms R, et al. BK virus-specific T cells for use in cellular therapy show specificity to multiple antigens and polyfunctional cytokine responses. *Transplantation*. 2011;92(10):1077-1084.
114. Blazquez-Navarro A, Schachtner T, Stervbo U, et al. Differential T cell response against BK virus regulatory and structural antigens: A viral dynamics modelling approach. *PLOS Comput Biol*. 2018;14(5):e1005998.
115. Trydzenskaya H, Sattler A, Müller K, et al. Novel approach for improved assessment of phenotypic and functional characteristics of BKV-specific T-cell immunity. *Transplantation*. 2011;92(11):1269-1277.
116. Weist BJD, Schmueck M, Fuehrer H, Sattler A, Reinke P, Babel N. The role of CD4(+) T cells in BKV-specific T cell immunity. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 2014;203(6):395-408.
117. Weist BJD, Wehler P, El Ahmad L, et al. A revised strategy for monitoring BKV-specific cellular immunity in kidney transplant patients. *Kidney Int*. 2015;88(6):1293-1303.
118. Cioni M, Leboeuf C, Comoli P, Ginevri F, Hirsch HH. Characterization of Immunodominant BK Polyomavirus 9mer Epitope T Cell Responses. *Am J Transplant*. 2016;16(4):1193-1206.
119. Leuzinger K, Kaur A, Wilhelm M, Hirsch HH. Variations in BK Polyomavirus Immunodominant Large Tumor Antigen-Specific 9mer CD8 T-Cell Epitopes Predict Altered HLA-Presentation and Immune Failure. *Viruses*. 2020;12(12):1476.
120. Babel N, Volk HD, Reinke P. BK polyomavirus infection and nephropathy: the virus-immune system interplay. *Nat Rev Nephrol*. 2011;7(7):399-406.
121. Zeng G, Huang Y, Huang Y, Lyu Z, Lesniak D, Randhawa P. Antigen-Specificity of T Cell Infiltrates in Biopsies With T Cell-Mediated Rejection and BK Polyomavirus Viremia: Analysis by Next Generation Sequencing. *Am J Transplant*. 2016;16(11):3131-3138.
122. Kaur A, Wilhelm M, Wilk S, Hirsch HH. BK polyomavirus-specific antibody and T-cell responses in kidney transplantation: update. *Curr Opin Infect Dis*. 2019;32(6):575-583.
123. Bodaghi S, Comoli P, Bösch R, et al. Antibody responses to recombinant polyomavirus BK large T and VP1 proteins in young kidney transplant patients. *J Clin Microbiol*. 2009;47(8):2577-2585.
124. Ginevri F, De Santis R, Comoli P, et al. Polyomavirus BK infection in pediatric kidney-allograft recipients: a single-center analysis of incidence, risk factors, and novel therapeutic approaches. *Transplantation*. 2003;75(8):1266-1270.

125. Smith JM, McDonald RA, Finn LS, Healey PJ, Davis CL, Limaye AP. Polyomavirus Nephropathy in Pediatric Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant.* 2004;4(12):2109-2117.
126. Bohl DL, Brennan DC, Ryschkewitsch C, Gaudreault-Keener M, Major EO, Storch GA. BK virus antibody titers and intensity of infections after renal transplantation. *J Clin Virol.* 2008;43(2):184-189.
127. Wunderink HF, van der Meijden E, van der Blij-de Brouwer CS, et al. Pretransplantation Donor–Recipient Pair Seroreactivity Against BK Polyomavirus Predicts Viremia and Nephropathy After Kidney Transplantation. *Am J Transplant.* 2017;17(1):161-172.
128. Solis M, Velay A, Porcher R, et al. Neutralizing Antibody-Mediated Response and Risk of BK Virus-Associated Nephropathy. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2018;29(1):326-334.
129. Dakroub F, Touzé A, Sater FA, et al. Impact of pre-graft serology on risk of BKPyV infection post-renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2022;37(4):781-788.
130. Abend JR, Changala M, Sathe A, et al. Correlation of BK Virus Neutralizing Serostatus With the Incidence of BK Viremia in Kidney Transplant Recipients. *Transplantation.* Published online June 1, 2016.
131. Wunderink HF, van der Meijden E, van der Blij-de Brouwer CS, et al. Stability of BK polyomavirus IgG seroreactivity and its correlation with preceding viremia. *J Clin Virol.* 2017;90:46-51.
132. Purtha WE, Tedder TF, Johnson S, Bhattacharya D, Diamond MS. Memory B cells, but not long-lived plasma cells, possess antigen specificities for viral escape mutants. *J Exp Med.* 2011;208(13):2599-2606.
133. Funk GA, Gosert R, Comoli P, Ginevri F, Hirsch HH. Polyomavirus BK Replication Dynamics In Vivo and In Silico to Predict Cytopathology and Viral Clearance in Kidney Transplants. *Am J Transplant.* 2008;8(11):2368-2377.
134. Leuzinger K, Naegele K, Schaub S, Hirsch HH. Quantification of plasma BK polyomavirus loads is affected by sequence variability, amplicon length, and non-encapsidated viral DNA genome fragments. *J Clin Virol.* 2019;121:104210.
135. Hirsch HH. Human Polyomavirus and Papillomavirus Infection and Disease Posttransplant. In: Ljungman P, Snyderman D, Boeckh M, eds. *Transplant Infections: Fourth Edition.* Springer International Publishing; 2016:631-652.
136. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med.* 2002;347(7):488-496.
137. Brennan DC, Agha I, Bohl DL, et al. Incidence of BK with tacrolimus versus



cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *Am J Transplant.* 2005;5(3):582-594.

138. Hardinger K, Koch M, Bohl D, Storch G, Brennan D. BK-Virus and the Impact of Preemptive Immunosuppression Reduction: 5-year Results. *Am J Transplant.* 2010;10(2):407-415.

139. Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Hourmant M, Sebille V, Andre-Garnier E, Imbert-Marcille BM. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2005;5(8):1926-1933.

140. Drachenberg CB, Hirsch HH, Papadimitriou JC, et al. Polyomavirus BK versus JC replication and nephropathy in renal transplant recipients: a prospective evaluation. *Transplantation.* 2007;84(3):323-330.

141. Borni-Duval C, Caillard S, Olagne J, et al. Risk factors for BK virus infection in the era of therapeutic drug monitoring. *Transplantation.* 2013;95(12):1498-1505.

142. Albasha W, Vahdani G, Ashoka A, Bracamonte E, Yau AA. Native BK virus nephropathy in lung transplant: a case report and literature review. *Clin Kidney J.* 2022;15(4):808-811.

143. Kuppachi S, Kaur D, Holanda DG, Thomas CP. BK polyoma virus infection and renal disease in non-renal solid organ transplantation. *Clin Kidney J.* 2016;9(2):310-318.

144. Mallavarapu RK, Sanoff SL, Howell DN, Roberts JK. BK virus nephropathy in non-renal solid organ transplant recipients: Are we looking hard enough? *Clin Transplant.* 2021;35(5):e14265.

145. Demey B, Tinez C, François C, et al. Risk factors for BK virus viremia and nephropathy after kidney transplantation: A systematic review. *J Clin Virol.* 2018;109:6-12.

146. Mindlova M, Boucek P, Saudek F, et al. Prevalence and risk factors of polyomavirus BK replication in simultaneous pancreas/kidney transplant recipients from a single transplant center. *Clin Transplant.* 2012;26(2):267-274.

147. Jacobi J, Prignitz A, Büttner M, et al. BK viremia and polyomavirus nephropathy in 352 kidney transplants; risk factors and potential role of mTOR inhibition. *BMC Nephrol.* 2013;14:207.

148. Shenagari M, Monfared A, Eghtedari H, et al. BK virus replication in renal transplant recipients: Analysis of potential risk factors may contribute in reactivation. *J Clin Virol.* 2017;96:7-11.

149. Maliakkal JG, Brennan DC, Goss C, et al. Ureteral stent placement and immediate graft function are associated with increased risk of BK viremia in the first year after kidney transplantation. *Transpl Int.* 2017;30(2):153-161.

150. Hashim F, Rehman S, Gregg JA, Dharnidharka VR. Ureteral Stent Placement Increases the Risk for Developing BK Viremia after Kidney Transplantation. *J Transplant.* 2014;2014:459747.
151. Wingate JT, Brandenberger J, Weiss A, Scovel LG, Kuhr CS. Ureteral stent duration and the risk of BK polyomavirus viremia or bacteriuria after kidney transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2017;19(1).
152. Vasudev B, Hariharan S, Hussain SA, Zhu YR, Bresnahan BA, Cohen EP. BK virus nephritis: Risk factors, timing, and outcome in renal transplant recipients. *Kidney Int.* 2005;68(4):1834-1839.
153. Sharif A, Alachkar N, Bagnasco S, et al. Incidence and Outcomes of BK Virus Allograft Nephropathy among ABO- and HLA-Incompatible Kidney Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012;7(8):1320-1327.
154. Bohl DL, Storch GA, Ryschkewitsch C, et al. Donor origin of BK virus in renal transplantation and role of HLA C7 in susceptibility to sustained BK viremia. *Am J Transplant.* 2005;5(9):2213-2221.
155. Wunderink HF, Haasnoot GW, de Brouwer CS, et al. Reduced Risk of BK Polyomavirus Infection in HLA-B51–positive Kidney Transplant Recipients. *Transplantation.* 2019;103(3):604-612.
156. Masutani K, Ninomiya T, Randhawa P. HLA-A2, HLA-B44 and HLA-DR15 are associated with lower risk of BK viremia. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28(12):3119-3126.
157. Halloran PF. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *N Engl J Med.* 2004;351(26):2715-2729.
158. Dharnidharka VR, Cherikh WS, Abbott KC. An OPTN Analysis of National Registry Data on Treatment of BK Virus Allograft Nephropathy in the United States. *Transplantation.* 2009;87(7):1019-1026.
159. Barbosa D, Kahwaji J, Puliyaanda D, et al. Polyomavirus BK viremia in kidney transplant recipients after desensitization with IVIG and rituximab. *Transplantation.* 2014;97(7):755-761.
160. Dadhania D, Snopkowski C, Ding R, et al. Epidemiology of BK virus in renal allograft recipients: independent risk factors for BK virus replication. *Transplantation.* 2008;86(4):521-528.
161. Schachtner T, Stein M, Babel N, Reinke P. The Loss of BKV-specific Immunity From Pretransplantation to Posttransplantation Identifies Kidney Transplant Recipients at Increased Risk of BKV Replication. *Am J Transplant.* 2015;15(8):2159-2169.
162. Hirsch HH, Vincenti F, Friman S, et al. Polyomavirus BK replication in de novo kidney transplant patients receiving tacrolimus or cyclosporine: a prospective, randomized, multicenter

study. *Am J Transplant*. 2013;13(1):136-145.

163. Thangaraju S, Gill J, Wright A, Dong J, Rose C, Gill J. Risk Factors for BK Polyoma Virus Treatment and Association of Treatment With Kidney Transplant Failure: Insights From a Paired Kidney Analysis. *Transplantation*. 2016;100(4):854-861.

164. Sommerer C, Suwelack B, Dragun D, et al. An open-label, randomized trial indicates that everolimus with tacrolimus or cyclosporine is comparable to standard immunosuppression in de novo kidney transplant patients. *Kidney Int*. 2019;96(1):231-244.

165. Manitpisitkul W, Drachenberg C, Ramos E, et al. Maintenance immunosuppressive agents as risk factors for BK virus nephropathy: a case-control study. *Transplantation*. 2009;88(1):83-88.

166. Cosio FG, Amer H, Grande JP, Larson TS, Stegall MD, Griffin MD. Comparison of low versus high tacrolimus levels in kidney transplantation: assessment of efficacy by protocol biopsies. *Transplantation*. 2007;83(4):411-416.

167. Grellier J, Hirsch HH, Mengelle C, et al. Impact of donor BK polyomavirus replication on recipient infections in living donor transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2018;20(4):e12917.

168. Verghese PS, Schmeling DO, Knight JA, Matas AJ, Balfour HH. The impact of donor viral replication at transplant on recipient infections posttransplant: a prospective study. *Transplantation*. 2015;99(3):602-608.

169. Sood P, Senanayake S, Sujeet K, et al. Donor and recipient BKV-specific IgG antibody and posttransplantation BKV infection: a prospective single-center study. *Transplantation*. 2013;95(6):896-902.

170. Cesaro S, Dalianis T, Hanssen Rinaldo C, et al. ECIL guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of BK polyomavirus-associated haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(1):12-21.

171. Arthur RR, Shah KV, Charache P, Saral R. BK and JC virus infections in recipients of bone marrow transplants. *J Infect Dis*. 1988;158(3):563-569.

172. Bedi A, Miller CB, Hanson JL, et al. Association of BK virus with failure of prophylaxis against hemorrhagic cystitis following bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*. Published online September 21, 2016.

173. Arthur RR, Shah KV, Baust SJ, Santos GW, Saral R. Association of BK viraemia with hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants. *N Engl J Med*. 1986;315(4):230-234.

174. Cesaro S, Facchin C, Tridello G, et al. A prospective study of BK-virus-associated haemorrhagic cystitis in paediatric patients undergoing allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41(4):363-370.

175. Hassan Z, Remberger M, Svenberg P, et al. Hemorrhagic cystitis: a retrospective single-center survey. *Clin Transplant*. 2007;21(5):659-667.
176. Graf FE, Hirsch HH. BK Polyomavirus After Solid Organ and Hematopoietic Cell Transplantation: One Virus – Three Diseases. In: Morris MI, Kotton CN, Wolfe CR, eds. *Emerging Transplant Infections: Clinical Challenges and Implications*. Springer International Publishing; 2021:807-831.
177. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*. 2008;319(5866):1096-1100.
178. Bouvard V, Baan RA, Grosse Y, et al. Carcinogenicity of malaria and of some polyomaviruses. *Lancet Oncol*. 2012;13(4):339-340.
179. Kumari K, Pradeep I, Kakkar A, et al. BK polyomavirus and urothelial carcinoma: Experience at a tertiary care centre in India with review of literature. *Ann Diagn Pathol*. 2019;40:77-80.
180. Anzivino E, Zingaropoli MA, Iannetta M, et al. Archetype and Rearranged Non-coding Control Regions in Urothelial Bladder Carcinoma of Immunocompetent Individuals. *Cancer Genomics Proteomics*. 2016;13(6):499-509.
181. Müller DC, Rämö M, Naegele K, et al. Donor-derived, metastatic urothelial cancer after kidney transplantation associated with a potentially oncogenic BK polyomavirus. *J Pathol*. 2018;244(3):265-270.
182. Papadimitriou JC, Randhawa P, Rinaldo CH, Drachenberg CB, Alexiev B, Hirsch HH. BK Polyomavirus Infection and Renourinary Tumorigenesis. *Am J Transplant*. 2016;16(2):398-406.
183. Liu S, Chaudhry MR, Berrebi AA, et al. Polyomavirus Replication and Smoking Are Independent Risk Factors for Bladder Cancer After Renal Transplantation. *Transplantation*. 2017;101(6):1488-1494.
184. Gupta G, Kuppachi S, Kalil RS, Buck CB, Lynch CF, Engels EA. Treatment for presumed BK polyomavirus nephropathy and risk of urinary tract cancers among kidney transplant recipients in the United States. *Am J Transplant*. 2018;18(1):245-252.
185. Rogers R, Gohh R, Noska A. Urothelial cell carcinoma after BK polyomavirus infection in kidney transplant recipients: A cohort study of veterans. *Transpl Infect Dis*. 2017;19(5).
186. Starrett GJ, Buck CB. BK polyomavirus is a cause of bladder cancer. *Curr Opin Virol*. 2019;39:8-15.
187. Rajpoot DK, Gomez A, Tsang W, Shanberg A. Ureteric and urethral stenosis: a complication of BK virus infection in a pediatric renal transplant patient. *Pediatr Transplant*. 2007;11(4):433-435.

188. Chang CYM, Gangji A, Chorneyko K, Kapoor A. Urological manifestations of BK polyomavirus in renal transplant recipients. *Can J Urol*. 2005;12(5):2829-2836.
189. Hwang YY, Sim J, Leung AYH, Lie AKW, Kwong YL. BK virus-associated bilateral ureteric stenosis after haematopoietic SCT: viral kinetics and successful treatment. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(5):745-746.
190. van Gorder MA, Della Pelle P, Henson JW, Sachs DH, Cosimi AB, Colvin RB. Cynomolgus polyoma virus infection: a new member of the polyoma virus family causes interstitial nephritis, ureteritis, and enteritis in immunosuppressed cynomolgus monkeys. *Am J Pathol*. 1999;154(4):1273-1284.
191. Akazawa Y, Terada Y, Yamane T, et al. Fatal BK virus pneumonia following stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2012;14(6):E142-146.
192. Vidal JE, Fink MC, Cedeno-Laurent F, et al. BK virus associated meningoencephalitis in an AIDS patient treated with HAART. *AIDS Res Ther*. 2007;4:13.
193. Behre G, Becker M, Christopeit M. BK virus encephalitis in an allogeneic hematopoietic stem cell recipient. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42(7):499.
194. Daveson KL, Ong CW, Bowden S, Koina ME, Hallam LA. BK virus-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Med J Aust*. 2013;198(4):216-218.
195. Rocha A, Faria S, Costa T, Marques L, Freitas C, Mota C. BK virus nephropathy complicated with meningoencephalitis after kidney transplantation. *Pediatr Transplant*. 2014;18(2):E48-51.
196. Medeiros PV, Abagge KT, Carvalho VO, Bonfim CM, Raboni SM. Polyomavirus BK: possibly associated skin eruption in a patient with hemorrhagic cystitis. *Pediatr Dermatol*. 2011;28(1):76-77.
197. Hedquist BG, Bratt G, Hammarin AL, et al. Identification of BK virus in a patient with acquired immune deficiency syndrome and bilateral atypical retinitis. *Ophthalmology*. 1999;106(1):129-132.
198. Petrogiannis-Haliotis T, Sakoulas G, Kirby J, et al. BK-related polyomavirus vasculopathy in a renal-transplant recipient. *N Engl J Med*. 2001;345(17):1250-1255.
199. Solis M, Meddeb M, Sueur C, et al. Sequence Variation in Amplification Target Genes and Standards Influences Interlaboratory Comparison of BK Virus DNA Load Measurement. *J Clin Microbiol*. 2015;53(12):3842-3852.
200. Hayden RT, Sun Y, Tang L, et al. Progress in Quantitative Viral Load Testing: Variability and Impact of the WHO Quantitative International Standards. *J Clin Microbiol*. 2017;55(2):423-430.
201. Bateman AC, Greninger AL, Atienza EE, Limaye AP, Jerome KR, Cook L.

Quantification of BK Virus Standards by Quantitative Real-Time PCR and Droplet Digital PCR Is Confounded by Multiple Virus Populations in the WHO BKV International Standard. *Clin Chem*. 2017;63(3):761-769.

202. Nicleleit 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(18):1309-1315.

203. Kuppachi S, Thomas B, Kokko KE. BK virus in the kidney transplant patient. *Am J Med Sci*. 2013;345(6):482-488.

204. Sawinski D, Goral S. BK virus infection: an update on diagnosis and treatment. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(2):209-217.

205. Nicleleit V, True K, Detwiler R, Kozlowski T, Singh H. Risk Assessment for Polyomavirus Nephropathy Using Urine Cytology and the Detection of Decoy Cells: Cheap and Efficient. *Transplantation*. 2012;94(7):e42.

206. Chantziantonou N, Joudeh AA, Hamed RMA, Al-Abbadi MA. Significance, cytomorphology of decoy cells in polyomavirus-associated nephropathy: Review of clinical, histopathological, and virological correlates with commentary. *J Am Soc Cytopathol*. 2016;5(2):71-85.

207. Singh HK, Andreoni KA, Madden V, et al. Presence of urinary Haufen accurately predicts polyomavirus nephropathy. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2009;20(2):416-427.

208. Nicleleit V, Davis VG, Thompson B, Singh HK. The Urinary Polyomavirus-Haufen Test: A Highly Predictive Non-Invasive Biomarker to Distinguish “Presumptive” from “Definitive” Polyomavirus Nephropathy: How to Use It—When to Use It—How Does It Compare to PCR Based Assays? *Viruses*. 2021;13(1):135.

209. Menter T, Mayr M, Schaub S, Mihatsch MJ, Hirsch HH, Hopfer H. Pathology of resolving polyomavirus-associated nephropathy. *Am J Transplant Transpl Surg*. 2013;13(6):1474-1483.

210. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Chaudhry MR, et al. Histological Evolution of BK Virus-Associated Nephropathy: Importance of Integrating Clinical and Pathological Findings. *Am J Transplant*. Published online April 19, 2017.

211. Drachenberg RC, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, et al. Morphological spectrum of polyoma virus disease in renal allografts: diagnostic accuracy of urine cytology. *Am J Transplant*. 2001;1(4):373-381.

212. Hirsch HH, Randhawa PS, AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation-Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant*. 2019;33(9):e13528.

213. Nicleleit V, Singh HK, Randhawa P, et al. The Banff Working Group Classification of Definitive Polyomavirus Nephropathy: Morphologic Definitions and Clinical Correlations. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2018;29(2):680-693.
214. Nicleleit V, Singh HK, Dadhania D, et al. The 2018 Banff Working Group classification of definitive polyomavirus nephropathy: A multicenter validation study in the modern era. *Am J Transplant*. 2021;21(2):669-680.
215. Kowalewska J, El Moudden I, Perkowska-Ptasinska A, et al. Assessment of the Banff Working Group classification of definitive BK polyomavirus nephropathy. *Transpl Int*. 2021;34(11):2286-2296.
216. Bouatou Y, Nguyen TQ, Roelofs JJTH, et al. A Multicenter Application of the 2018 Banff Classification for BK Polyomavirus-associated Nephropathy in Renal Transplantation. *Transplantation*. 2019;103(12):2692-2700.
217. Wang M, Zhou Q, Wang H, Chen Y, Chen J. An application of the 2018 Banff Classification for BK polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2021;23(3):e13557.
218. McGilvray ID, Lajoie G, Humar A, Cattral MS. Polyomavirus Infection and Acute Vascular Rejection in a Kidney Allograft: Coincidence or Mimicry? *Am J Transplant*. 2003;3(4):501-504.
219. Bischof N, Hirsch HH, Wehmeier C, et al. Reducing calcineurin inhibitor first for treating BK polyomavirus replication after kidney transplantation: long-term outcomes. *Nephrol Dial Transplant*. 2019;34(7):1240-1250.
220. Egli A, Köhli S, Dickenmann M, Hirsch HH. Inhibition of Polyomavirus BK-Specific T-Cell Responses by Immunosuppressive Drugs. *Transplantation*. 2009;88(10):1161-1168.
221. Acott P, O'Regan PA, Crocker JFS. Suppression of early and chronic BK polyoma virus replication by mycophenolic acid in Vero cells. *Transpl Int*. 2009;22(2):225-231.
222. Acott PD, O'Regan PA, Lee SH, Crocker JFS. In vitro effect of cyclosporin A on primary and chronic BK polyoma virus infection in Vero E6 cells. *Transpl Infect Dis*. 2008;10(6):385-390.
223. Hirsch HH, Yakhontova K, Lu M, Manzetti J. BK Polyomavirus Replication in Renal Tubular Epithelial Cells Is Inhibited by Sirolimus, but Activated by Tacrolimus Through a Pathway Involving FKBP-12. *Am J Transplant*. 2016;16(3):821-832.
224. Li YJ, Weng CH, Lai WC, et al. A suppressive effect of cyclosporine A on replication and noncoding control region activation of polyomavirus BK virus. *Transplantation*. 2010;89(3):299-306.
225. Liacini A, Seamone ME, Muruve DA, Tibbles LA. Anti-BK virus mechanisms of sirolimus and leflunomide alone and in combination: toward a new therapy for BK virus

infection. *Transplantation*. 2010;90(12):1450-1457.

226. Alvarez Orellana J, Kwun HJ, Artusi S, Chang Y, Moore PS. Sirolimus and Other Mechanistic Target of Rapamycin Inhibitors Directly Activate Latent Pathogenic Human Polyomavirus Replication. *J Infect Dis*. 2020;224(7):1160-1169.

227. Johnston O, Jaswal D, Gill JS, Doucette S, Fergusson DA, Knoll GA. Treatment of polyomavirus infection in kidney transplant recipients: a systematic review. *Transplantation*. 2010;89(9):1057-1070.

228. Ginevri F, Azzi A, Hirsch HH, et al. Prospective monitoring of polyomavirus BK replication and impact of pre-emptive intervention in pediatric kidney recipients. *Am J Transplant*. 2007;7(12):2727-2735.

229. Schaub S, Hirsch HH, Dickenmann M, et al. Reducing immunosuppression preserves allograft function in presumptive and definitive polyomavirus-associated nephropathy. *Am J Transplant*. 2010;10(12):2615-2623.

230. Sood P, Senanayake S, Sujeet K, et al. Management and outcome of BK viremia in renal transplant recipients: a prospective single-center study. *Transplantation*. 2012;94(8):814-821.

231. Chen XT, Li J, Deng RH, et al. The therapeutic effect of switching from tacrolimus to low-dose cyclosporine A in renal transplant recipients with BK virus nephropathy. *Biosci Rep*. 2019;39(2):BSR20182058.

232. Saad ER, Bresnahan BA, Cohen EP, et al. Successful treatment of BK viremia using reduction in immunosuppression without antiviral therapy. *Transplantation*. 2008;85(6):850-854.

233. Seifert ME, Gunasekaran M, Horwedel TA, et al. Polyomavirus Reactivation and Immune Responses to Kidney-Specific Self-Antigens in Transplantation. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2017;28(4):1314-1325.

234. Sawinski D, Forde KA, Trofe-Clark J, et al. Persistent BK viremia does not increase intermediate-term graft loss but is associated with de novo donor-specific antibodies. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2015;26(4):966-975.

235. Cheungpasitporn W, Kremers WK, Lorenz E, et al. De novo donor-specific antibody following BK nephropathy: The incidence and association with antibody-mediated rejection. *Clin Transplant*. 2018;32(3):e13194.

236. Devresse A, Tinel C, Vermorel A, et al. No clinical benefit of rapid versus gradual tapering of immunosuppression to treat sustained BK virus viremia after kidney transplantation: a single-center experience. *Transpl Int*. 2019;32(5):481-492.

237. Tedesco-Silva H, Pascual J, Viklicky O, et al. Safety of Everolimus With Reduced Calcineurin Inhibitor Exposure in De Novo Kidney Transplants: An Analysis From the Randomized TRANSFORM Study. *Transplantation*. 2019;103(9):1953-1963.



238. Wojciechowski D, Chandran S, Webber A, Hirose R, Vincenti F. Mycophenolate Mofetil Withdrawal With Conversion to Everolimus to Treat BK Virus Infection in Kidney Transplant Recipients. *Transplant Proc.* 2017;49(8):1773-1778.
239. Velay A, Solis M, Benotmane I, et al. Intravenous Immunoglobulin Administration Significantly Increases BKPyV Genotype-Specific Neutralizing Antibody Titers in Kidney Transplant Recipients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(8).
240. Kable K, Davies CD, O'connell PJ, Chapman JR, Nankivell BJ. Clearance of BK Virus Nephropathy by Combination Antiviral Therapy With Intravenous Immunoglobulin. *Transplant Direct.* 2017;3(4):e142.
241. Naef B, Nilsson J, Wuethrich RP, Mueller TF, Schachtner T. Intravenous immunoglobulins do not prove beneficial to reduce alloimmunity among kidney transplant recipients with BKV-associated nephropathy. *Transpl Int.* 2021;34(8):1481-1493.
242. Bernhoff E, Gutteberg TJ, Sandvik K, Hirsch HH, Rinaldo CH. Cidofovir inhibits polyomavirus BK replication in human renal tubular cells downstream of viral early gene expression. *Am J Transplant.* 2008;8(7):1413-1422.
243. Farasati NA, Shapiro R, Vats A, Randhawa P. Effect of leflunomide and cidofovir on replication of BK virus in an in vitro culture system. *Transplantation.* 2005;79(1):116-118.
244. Philippe M, Ranchon F, Gilis L, et al. Cidofovir in the Treatment of BK Virus-Associated Hemorrhagic Cystitis after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* 2016;22(4):723-730.
245. Randhawa P, Farasati NA, Shapiro R, Hostetler KY. Ether lipid ester derivatives of cidofovir inhibit polyomavirus BK replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(4):1564-1566.
246. Rinaldo CH, Gosert R, Bernhoff E, Finstad S, Hirsch HH. 1-O-hexadecyloxypropyl cidofovir (CMX001) effectively inhibits polyomavirus BK replication in primary human renal tubular epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(11):4714-4722.
247. Tylden GD, Hirsch HH, Rinaldo CH. Brincidofovir (CMX001) inhibits BK polyomavirus replication in primary human urothelial cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):3306-3316.
248. Papanicolaou GA, Lee YJ, Young JW, et al. Brincidofovir for Polyomavirus-Associated Nephropathy After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Am J Kidney Dis.* 2015;65(5):780-784.
249. Reisman L, Habib S, McClure GB, Latiolais LS, Vanchiere JA. Treatment of BK virus-associated nephropathy with CMX001 after kidney transplantation in a young child. *Pediatr Transplant.* 2014;18(7):E227-E231.
250. Chimerix. *A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multiple*

*Dose Study of the Safety, Tolerability and Population Pharmacokinetics of CMX001 in Post-Transplant Subjects With BK Virus Viruria.* clinicaltrials.gov; 2021.

251. Bernhoff E, Tylden GD, Kjerpeseth LJ, Gutteberg TJ, Hirsch HH, Rinaldo CH. Leflunomide inhibition of BK virus replication in renal tubular epithelial cells. *J Virol.* 2010;84(4):2150-2156.

252. Josephson MA, Gillen D, Javaid B, et al. Treatment of renal allograft polyoma BK virus infection with leflunomide. *Transplantation.* 2006;81(5):704-710.

253. Faguer S, Hirsch HH, Kamar N, et al. Leflunomide treatment for polyomavirus BK-associated nephropathy after kidney transplantation. *Transpl Int.* 2007;20(11):962-969.

254. Leca N, Muczynski KA, Jefferson JA, et al. Higher levels of leflunomide are associated with hemolysis and are not superior to lower levels for BK virus clearance in renal transplant patients. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 2008;3(3):829-835.

255. Teschner S, Gerke P, Geyer M, et al. Leflunomide therapy for polyomavirus-induced allograft nephropathy: efficient BK virus elimination without increased risk of rejection. *Transplant Proc.* 2009;41(6):2533-2538.

256. Krisl JC, Taber DJ, Pilch N, et al. Leflunomide efficacy and pharmacodynamics for the treatment of BK viral infection. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 2012;7(6):1003-1009.

257. Cuellar-Rodriguez J, Stephany B, Poggio E, et al. Contrasting patterns of viral load response in transplant recipients with BK polyomavirus DNAemia on leflunomide therapy. *Clin Transplant.* 2013;27(3):E230-236.

258. Nesselhauf N, Strutt J, Bastani B. Evaluation of leflunomide for the treatment of BK viremia and biopsy proven BK nephropathy; a single center experience. *J Nephropathol.* 2016;5(1):34-37.

259. Keller N, Duquennoy S, Conrad A, et al. Clinical utility of leflunomide for BK polyomavirus associated nephropathy in kidney transplant recipients: A multicenter retrospective study. *Transpl Infect Dis.* 2019;21(2):e13058.

260. Guasch A, Roy-Chaudhury P, Woodle ES, et al. Assessment of Efficacy and Safety of FK778 in Comparison With Standard Care in Renal Transplant Recipients With Untreated BK Nephropathy. *Transplantation.* 2010;90(8):891-897.

261. Ali SH, Chandraker A, DeCaprio JA. Inhibition of Simian virus 40 large T antigen helicase activity by fluoroquinolones. *Antivir Ther.* 2007;12(1):1-6.

262. Sharma BN, Li R, Bernhoff E, Gutteberg TJ, Rinaldo CH. Fluoroquinolones inhibit human polyomavirus BK (BKV) replication in primary human kidney cells. *Antiviral Res.* 2011;92(1):115-123.

263. Knoll GA, Humar A, Fergusson D, et al. Levofloxacin for BK virus prophylaxis

following kidney transplantation: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2014;312(20):2106-2114.

264. Patel SJ, Knight RJ, Kuten SA, et al. Ciprofloxacin for BK viremia prophylaxis in kidney transplant recipients: Results of a prospective, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Transplant*. 2019;19(6):1831-1837.

265. Lee BT, Gabardi S, Grafals M, et al. Efficacy of Levofloxacin in the Treatment of BK Viremia: A Multicenter, Double-Blinded, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(3):583-589.

266. Moriyama T, Sorokin A. Repression of BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cells by pravastatin. *Transplantation*. 2008;85(9):1311-1317.

267. Gabardi S, Ramasamy S, Kim M, et al. Impact of HMG-CoA reductase inhibitors on the incidence of polyomavirus-associated nephropathy in renal transplant recipients with human BK polyomavirus viremia. *Transpl Infect Dis*. 2015;17(4):536-543.

268. Randhawa P, Pastrana DV, Zeng G, et al. Commercially Available Immunoglobulins Contain Virus Neutralizing Antibodies Against All Major Genotypes of Polyomavirus BK. *Am J Transplant*. 2015;15(4):1014-1020.

269. Randhawa PS, Schonder K, Shapiro R, Farasati N, Huang Y. Polyomavirus BK Neutralizing Activity in Human Immunoglobulin Preparations. *Transplantation*. 2010;89(12):1462-1465.

270. Renner FC, Dietrich H, Bulut N, et al. The risk of polyomavirus-associated graft nephropathy is increased by a combined suppression of CD8 and CD4 cell-dependent immune effects. *Transplant Proc*. 2013;45(4):1608-1610.

271. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*. 2020;5(4):536-544.

272. Fung TS, Liu DX. Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction. *Annu Rev Microbiol*. 2019;73:529-557.

273. Drosten C, Günther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 2003;348(20):1967-1976.

274. Peiris JSM, Lai ST, Poon LLM, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet Lond Engl*. 2003;361(9366):1319-1325.

275. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med*. 2012;367(19):1814-1820.

276. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020;382(8):727-733.

277. CDC. Healthcare Workers. Centers for Disease Control and Prevention.

278. Triggler CR, Bansal D, Ding H, et al. A Comprehensive Review of Viral Characteristics, Transmission, Pathophysiology, Immune Response, and Management of SARS-CoV-2 and COVID-19 as a Basis for Controlling the Pandemic. *Front Immunol.* 2021;12.
279. Menachery VD, Graham RL, Baric RS. Jumping species-a mechanism for coronavirus persistence and survival. *Curr Opin Virol.* 2017;23:1-7.
280. Peck KM, Burch CL, Heise MT, Baric RS. Coronavirus Host Range Expansion and Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Emergence: Biochemical Mechanisms and Evolutionary Perspectives. *Annu Rev Virol.* 2015;2(1):95-117.
281. ECDC. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/COVID-19-vaccination-and-prioritisation-strategies.pdf>.
282. Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet.* 2020;395(10223):507-513.
283. Chan JFW, Kok KH, Zhu Z, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):221-236.
284. Yang H, Rao Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(11):685-700.
285. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020;367(6483):1260-1263.
286. Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *J Virol.* 2020;94(7):e00127-20.
287. Mandala VS, McKay MJ, Shcherbakov AA, Dregni AJ, Kolocouris A, Hong M. Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers. *Nat Struct Mol Biol.* 2020;27(12):1202-1208.
288. Hardenbrook NJ, Zhang P. A structural view of the SARS-CoV-2 virus and its assembly. *Curr Opin Virol.* 2022;52:123-134.
289. Nieto-Torres JL, DeDiego ML, Verdía-Báguena C, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Envelope Protein Ion Channel Activity Promotes Virus Fitness and Pathogenesis. *PLOS Pathog.* 2014;10(5):e1004077.
290. De Maio F, Lo Cascio E, Babini G, et al. Improved binding of SARS-CoV-2 Envelope protein to tight junction-associated PALS1 could play a key role in COVID-19 pathogenesis. *Microbes Infect.* 2020;22(10):592-597.
291. Nieto-Torres JL, Verdía-Báguena C, Jimenez-Guardeño JM, et al. Severe acute

respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. *Virology*. 2015;485:330-339.

292. Chang C ke, Hou MH, Chang CF, Hsiao CD, Huang T huang. The SARS coronavirus nucleocapsid protein--forms and functions. *Antiviral Res*. 2014;103:39-50.

293. McBride R, Van Zyl M, Fielding BC. The Coronavirus Nucleocapsid Is a Multifunctional Protein. *Viruses*. 2014;6(8):2991-3018.

294. Lu X, Pan J, Tao J, Guo D. SARS-CoV nucleocapsid protein antagonizes IFN- $\beta$  response by targeting initial step of IFN- $\beta$  induction pathway, and its C-terminal region is critical for the antagonism. *Virus Genes*. 2011;42(1):37-45.

295. Mu J, Xu J, Zhang L, et al. SARS-CoV-2-encoded nucleocapsid protein acts as a viral suppressor of RNA interference in cells. *Sci China Life Sci*. 2020;63(9):1413-1416.

296. Lucchese G. Epitopes for a 2019-nCoV vaccine. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(5):539-540.

297. Jin Z, Du X, Xu Y, et al. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature*. 2020;582(7811):289-293.

298. Ullrich S, Nitsche C. The SARS-CoV-2 main protease as drug target. *Bioorg Med Chem Lett*. 2020;30(17):127377.

299. Lee J, Worrall LJ, Vuckovic M, et al. Crystallographic structure of wild-type SARS-CoV-2 main protease acyl-enzyme intermediate with physiological C-terminal autoprocessing site. *Nat Commun*. 2020;11(1):5877.

300. Klemm T, Ebert G, Calleja DJ, et al. Mechanism and inhibition of the papain-like protease, PLpro, of SARS-CoV-2. *EMBO J*. 2020;39(18):e106275.

301. Jiang X, Chen ZJ. The role of ubiquitylation in immune defence and pathogen evasion. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(1):35-48.

302. Ziebuhr J. The coronavirus replicase. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;287:57-94.

303. Peng Q, Peng R, Yuan B, et al. Structural and Biochemical Characterization of the nsp12-nsp7-nsp8 Core Polymerase Complex from SARS-CoV-2. *Cell Rep*. 2020;31(11):107774.

304. Yan L, Zhang Y, Ge J, et al. Architecture of a SARS-CoV-2 mini replication and transcription complex. *Nat Commun*. 2020;11(1):5874.

305. Chen J, Malone B, Llewellyn E, et al. Structural Basis for Helicase-Polymerase Coupling in the SARS-CoV-2 Replication-Transcription Complex. *Cell*. 2020;182(6):1560-1573.e13.

306. Ivanov KA, Thiel V, Dobbe JC, van der Meer Y, Snijder EJ, Ziebuhr J. Multiple

enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase. *J Virol*. 2004;78(11):5619-5632.

307. Yan L, Ge J, Zheng L, et al. Cryo-EM Structure of an Extended SARS-CoV-2 Replication and Transcription Complex Reveals an Intermediate State in Cap Synthesis. *Cell*. 2021;184(1):184-193.e10.

308. Chen Y, Cai H, Pan J, et al. Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(9):3484-3489.

309. Bouvet M, Debarnot C, Imbert I, et al. In vitro reconstitution of SARS-coronavirus mRNA cap methylation. *PLoS Pathog*. 2010;6(4):e1000863.

310. Sutton G, Fry E, Carter L, et al. The nsp9 replicase protein of SARS-coronavirus, structure and functional insights. *Struct Lond Engl 1993*. 2004;12(2):341-353.

311. Daffis S, Szretter KJ, Schriewer J, et al. 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature*. 2010;468(7322):452-456.

312. Ramanathan A, Robb GB, Chan SH. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(16):7511-7526.

313. Sanjuán R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R. Viral mutation rates. *J Virol*. 2010;84(19):9733-9748.

314. Malone B, Chen J, Wang Q, et al. Structural basis for backtracking by the SARS-CoV-2 replication-transcription complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(19):e2102516118.

315. Kern DM, Sorum B, Mali SS, et al. Cryo-EM structure of SARS-CoV-2 ORF3a in lipid nanodiscs. *Nat Struct Mol Biol*. 2021;28(7):573-582.

316. Zhou Z, Huang C, Zhou Z, et al. Structural insight reveals SARS-CoV-2 ORF7a as an immunomodulating factor for human CD14+ monocytes. *iScience*. 2021;24(3):102187.

317. Flower TG, Buffalo CZ, Hooy RM, Allaire M, Ren X, Hurley JH. Structure of SARS-CoV-2 ORF8, a rapidly evolving immune evasion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(2):e2021785118.

318. Gao X, Zhu K, Qin B, Olieric V, Wang M, Cui S. Crystal structure of SARS-CoV-2 Orf9b in complex with human TOM70 suggests unusual virus-host interactions. *Nat Commun*. 2021;12(1):2843.

319. Burkard C, Verheije MH, Wicht O, et al. Coronavirus Cell Entry Occurs through the Endo-/Lysosomal Pathway in a Proteolysis-Dependent Manner. *PLOS Pathog*. 2014;10(11):e1004502.

320. Chen X, Li R, Pan Z, et al. Human monoclonal antibodies block the binding of SARS-CoV-2 spike protein to angiotensin converting enzyme 2 receptor. *Cell Mol Immunol*.

2020;17(6):647-649.

321. Guo T, Fan Y, Chen M, et al. Cardiovascular Implications of Fatal Outcomes of Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol.* 2020;5(7):811-818.

322. Tortorici MA, Veerler D. Chapter Four - Structural insights into coronavirus entry. In: Rey FA, ed. *Advances in Virus Research*. Vol 105. Complementary Strategies to Understand Virus Structure and Function. Academic Press; 2019:93-116.

323. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020;181(2):271-280.e8.

324. Beumer J, Geurts MH, Lamers MM, et al. A CRISPR/Cas9 genetically engineered organoid biobank reveals essential host factors for coronaviruses. *Nat Commun.* 2021;12(1):5498.

325. Ou X, Liu Y, Lei X, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun.* 2020;11(1):1620.

326. Diamond MS, Kanneganti TD. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. *Nat Immunol.* 2022;23(2):165-176.

327. Bayati A, Kumar R, Francis V, McPherson PS. SARS-CoV-2 infects cells after viral entry via clathrin-mediated endocytosis. *J Biol Chem.* 2021;296:100306.

328. Lamers MM, Haagmans BL. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2022;20(5):270-284.

329. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol.* 2020;41(12):1100-1115.

330. Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, et al. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann Intern Med.* 2020;172(9):577-582.

331. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020;382(18):1708-1720.

332. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet.* 2020;395(10223):497-506.

333. Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA.* 2020;323(11):1061-1069.

334. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The Lancet.* 2020;395(10229):1054-1062.

335. ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*. 2012;307(23):2526-2533.
336. Han C, Duan C, Zhang S, et al. Digestive Symptoms in COVID-19 Patients With Mild Disease Severity: Clinical Presentation, Stool Viral RNA Testing, and Outcomes. *Am J Gastroenterol*. Published online April 15, 2020.
337. Shi S, Qin M, Shen B, et al. Association of Cardiac Injury With Mortality in Hospitalized Patients With COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Cardiol*. Published online March 25, 2020.
338. Basu-Ray I, Almaddah N k, Adeboye A, Soos MP. Cardiac Manifestations Of Coronavirus (COVID-19). In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2022.
339. Legrand M, Bell S, Forni L, et al. Pathophysiology of COVID-19-associated acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. 2021;17(11):751-764.
340. Bongiovanni M, Zago T. Acute hepatitis caused by asymptomatic COVID-19 infection. *J Infect*. 2021;82(1):e25-e26.
341. Helms J, Tacquard C, Severac F, et al. High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intensive Care Med*. Published online May 4, 2020.
342. Helms J, Kremer S, Merdji H, et al. Neurologic Features in Severe SARS-CoV-2 Infection. *N Engl J Med*. 2020;382(23):2268-2270.
343. Lersy F, Benotmane I, Helms J, et al. Cerebrospinal Fluid Features in Patients With Coronavirus Disease 2019 and Neurological Manifestations: Correlation with Brain Magnetic Resonance Imaging Findings in 58 Patients. *J Infect Dis*. 2021;223(4):600-609.
344. Hamming I, Timens W, Bulthuis MLC, Lely AT, Navis GJ, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol*. 2004;203(2):631-637.
345. Lamers MM, Beumer J, van der Vaart J, et al. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science*. 2020;369(6499):50-54.
346. Williamson EJ, Walker AJ, Bhaskaran K, et al. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature*. 2020;584(7821):430-436.
347. Grasselli G, Zangrillo A, Zanella A, et al. Baseline Characteristics and Outcomes of 1591 Patients Infected With SARS-CoV-2 Admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. *JAMA*. 2020;323(16):1574-1581.
348. O'Driscoll M, Ribeiro Dos Santos G, Wang L, et al. Age-specific mortality and immunity patterns of SARS-CoV-2. *Nature*. 2021;590(7844):140-145.
349. Karagiannidis C, Mostert C, Hentschker C, et al. Case characteristics, resource use, and



outcomes of 10 021 patients with COVID-19 admitted to 920 German hospitals: an observational study. *Lancet Respir Med.* 2020;8(9):853-862.

350. Booth A, Reed AB, Ponzo S, et al. Population risk factors for severe disease and mortality in COVID-19: A global systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE.* 2021;16(3):e0247461.

351. COVID-19 Host Genetics Initiative. Mapping the human genetic architecture of COVID-19. *Nature.* 2021;600(7889):472-477.

352. Pairo-Castineira E, Clohisey S, Klaric L, et al. Genetic mechanisms of critical illness in COVID-19. *Nature.* 2021;591(7848):92-98.

353. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *N Engl J Med.* 2020;383(16):1522-1534.

354. Ahn JH, Kim J, Hong SP, et al. Nasal ciliated cells are primary targets for SARS-CoV-2 replication in the early stage of COVID-19. *J Clin Invest.* 131(13):e148517.

355. Hou YJ, Okuda K, Edwards CE, et al. SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. *Cell.* 2020;182(2):429-446.e14.

356. Khan M, Yoo SJ, Clijsters M, et al. Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb. *Cell.* 2021;184(24):5932-5949.e15.

357. Muus C, Luecken MD, Eraslan G, et al. Single-cell meta-analysis of SARS-CoV-2 entry genes across tissues and demographics. *Nat Med.* 2021;27(3):546-559.

358. Ramasamy S, Subbian S. Critical Determinants of Cytokine Storm and Type I Interferon Response in COVID-19 Pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 2021;34(3):e00299-20.

359. García-Sastre A, Biron CA. Type 1 Interferons and the Virus-Host Relationship: A Lesson in Détente. *Science.* 2006;312(5775):879-882.

360. Channappanavar R, Fehr AR, Zheng J, et al. IFN-I response timing relative to virus replication determines MERS coronavirus infection outcomes. *J Clin Invest.* 2019;129(9):3625-3639.

361. Bastard P, Rosen LB, Zhang Q, et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science.* 2020;370(6515):eabd4585.

362. Koning R, Bastard P, Casanova JL, Brouwer MC, van de Beek D, with the Amsterdam U.M.C. COVID-19 Biobank Investigators. Autoantibodies against type I interferons are associated with multi-organ failure in COVID-19 patients. *Intensive Care Med.* 2021;47(6):704-706.

363. Bastard P, Gervais A, Le Voyer T, et al. Autoantibodies neutralizing type I IFNs are present in ~4% of uninfected individuals over 70 years old and account for ~20% of COVID-

19 deaths. *Sci Immunol*. 2021;6(62):eabl4340.

364. Zhang Q, Bastard P, Liu Z, et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. 2020;370(6515):eabd4570.

365. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science*. 2020;369(6504):718-724.

366. Ziegler CGK, Miao VN, Owings AH, et al. Impaired local intrinsic immunity to SARS-CoV-2 infection in severe COVID-19. *Cell*. 2021;184(18):4713-4733.e22.

367. Feng E, Balint E, Poznanski SM, Ashkar AA, Loeb M. Aging and Interferons: Impacts on Inflammation and Viral Disease Outcomes. *Cells*. 2021;10(3):708.

368. Swiecki M, Colonna M. Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunol Rev*. 2010;234(1):142-162.

369. Venet M, Ribeiro MS, Décembre E, et al. Severe COVID-19 patients have impaired plasmacytoid dendritic cell-mediated control of SARS-CoV-2-infected cells. Published online October 10, 2021:2021.09.01.21262969.

370. Lee JS, Park S, Jeong HW, et al. Immunophenotyping of COVID-19 and influenza highlights the role of type I interferons in development of severe COVID-19. *Sci Immunol*. 2020;5(49):eabd1554.

371. Channappanavar R, Fehr AR, Vijay R, et al. Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice. *Cell Host Microbe*. 2016;19(2):181-193.

372. Lamers MM, van der Vaart J, Knoops K, et al. An organoid-derived bronchioalveolar model for SARS-CoV-2 infection of human alveolar type II-like cells. *EMBO J*. 2021;40(5):e105912.

373. Robinot R, Hubert M, de Melo GD, et al. SARS-CoV-2 infection induces the dedifferentiation of multiciliated cells and impairs mucociliary clearance. *Nat Commun*. 2021;12(1):4354.

374. Delorey TM, Ziegler CGK, Heimberg G, et al. COVID-19 tissue atlases reveal SARS-CoV-2 pathology and cellular targets. *Nature*. 2021;595(7865):107-113.

375. Katsura H, Sontake V, Tata A, et al. Human Lung Stem Cell-Based Alveolospheres Provide Insights into SARS-CoV-2-Mediated Interferon Responses and Pneumocyte Dysfunction. *Cell Stem Cell*. 2020;27(6):890-904.e8.

376. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med*. 2020;26(10):1636-1643.

377. Cardinal-Fernández P, Lorente JA, Ballén-Barragán A, Matute-Bello G. Acute Respiratory Distress Syndrome and Diffuse Alveolar Damage. New Insights on a Complex

Relationship. *Ann Am Thorac Soc.* 2017;14(6):844-850.

378. Katzenstein AL, Bloor CM, Leibow AA. Diffuse alveolar damage--the role of oxygen, shock, and related factors. A review. *Am J Pathol.* 1976;85(1):209-228.

379. Iba T, Levy JH, Levi M, Thachil J. Coagulopathy in COVID-19. *J Thromb Haemost JTH.* 2020;18(9):2103-2109.

380. Sebag SC, Bastarache JA, Ware LB. Therapeutic Modulation of Coagulation and Fibrinolysis in Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011;12(9):1481-1496.

381. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost JTH.* 2020;18(4):844-847.

382. Camprubí-Rimblas M, Tantinyà N, Bringué J, Guillamat-Prats R, Artigas A. Anticoagulant therapy in acute respiratory distress syndrome. *Ann Transl Med.* 2018;6(2):36.

383. Klok FA, Kruip MJHA, van der Meer NJM, et al. Confirmation of the high cumulative incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19: An updated analysis. *Thromb Res.* 2020;191:148-150.

384. Klok FA, Kruip MJHA, van der Meer NJM, et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res.* 2020;191:145-147.

385. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(1):34-45.

386. Bonaventura A, Vecchié A, Dagna L, et al. Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. *Nat Rev Immunol.* 2021;21(5):319-329.

387. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet Lond Engl.* 2020;395(10234):1417-1418.

388. Owens AP, Mackman N. Tissue factor and thrombosis: The clot starts here. *Thromb Haemost.* 2010;104(3):432-439.

389. Kenawy HI, Boral I, Bevington A. Complement-Coagulation Cross-Talk: A Potential Mediator of the Physiological Activation of Complement by Low pH. *Front Immunol.* 2015;6:215.

390. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood.* 2005;106(5):1604-1611.

391. Sang Y, Roest M, de Laat B, de Groot PG, Huskens D. Interplay between platelets and coagulation. *Blood Rev.* 2021;46:100733.

392. Page C, Pitchford S. Neutrophil and platelet complexes and their relevance to neutrophil recruitment and activation. *Int Immunopharmacol*. 2013;17(4):1176-1184.
393. Kambas K, Markiewski MM, Pneumatikos IA, et al. C5a and TNF-alpha up-regulate the expression of tissue factor in intra-alveolar neutrophils of patients with the acute respiratory distress syndrome. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008;180(11):7368-7375.
394. Skendros P, Mitsios A, Chrysanthopoulou A, et al. Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis. *J Clin Invest*. 2020;130(11):6151-6157.
395. Zuo Y, Warnock M, Harbaugh A, et al. Plasma tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in hospitalized COVID-19 patients. *Sci Rep*. 2021;11(1):1580.
396. Mackman N, Antoniak S, Wolberg AS, Kasthuri R, Key NS. Coagulation Abnormalities and Thrombosis in Patients Infected With SARS-CoV-2 and Other Pandemic Viruses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(9):2033-2044.
397. Streicher F, Jouvenet N. Stimulation of Innate Immunity by Host and Viral RNAs. *Trends Immunol*. 2019;40(12):1134-1148.
398. Acharya D, Liu G, Gack MU. Dysregulation of type I interferon responses in COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(7):397-398.
399. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *Int Rev Immunol*. 2011;30(1):16-34.
400. Carty M, Guy C, Bowie AG. Detection of Viral Infections by Innate Immunity. *Biochem Pharmacol*. 2021;183:114316.
401. Zhang Y, Chen S, Jin Y, Ji W, Zhang W, Duan G. An Update on Innate Immune Responses during SARS-CoV-2 Infection. *Viruses*. 2021;13(10):2060.
402. Schoggins JW. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annu Rev Virol*. 2019;6(1):567-584.
403. Burke JM, St Clair LA, Perera R, Parker R. SARS-CoV-2 infection triggers widespread host mRNA decay leading to an mRNA export block. *RNA N Y N*. 2021;27(11):1318-1329.
404. Liu G, Lee JH, Parker ZM, et al. ISG15-dependent activation of the sensor MDA5 is antagonized by the SARS-CoV-2 papain-like protease to evade host innate immunity. *Nat Microbiol*. 2021;6(4):467-478.
405. Chen K, Xiao F, Hu D, et al. SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Interacts with RIG-I and Represses RIG-Mediated IFN- $\beta$  Production. *Viruses*. 2020;13(1):47.
406. Li JY, Liao CH, Wang Q, et al. The ORF6, ORF8 and nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 inhibit type I interferon signaling pathway. *Virus Res*. 2020;286:198074.

407. Wu J, Shi Y, Pan X, et al. SARS-CoV-2 ORF9b inhibits RIG-I-MAVS antiviral signaling by interrupting K63-linked ubiquitination of NEMO. *Cell Rep.* 2021;34(7):108761.
408. Sui L, Zhao Y, Wang W, et al. SARS-CoV-2 Membrane Protein Inhibits Type I Interferon Production Through Ubiquitin-Mediated Degradation of TBK1. *Front Immunol.* 2021;12:662989.
409. Han L, Zhuang MW, Deng J, et al. SARS-CoV-2 ORF9b antagonizes type I and III interferons by targeting multiple components of the RIG-I/MDA-5-MAVS, TLR3-TRIF, and cGAS-STING signaling pathways. *J Med Virol.* 2021;93(9):5376-5389.
410. Xia H, Cao Z, Xie X, et al. Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2. *Cell Rep.* 2020;33(1):108234.
411. Thoms M, Buschauer R, Ameismeier M, et al. Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. *Science.* 2020;369(6508):1249-1255.
412. Moderbacher CR, Ramirez SI, Dan JM, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell.* 2020;183(4):996-1012.e19.
413. Weiskopf D, Schmitz KS, Raadsen MP, et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci Immunol.* 2020;5(48):eabd2071.
414. Tan AT, Linster M, Tan CW, et al. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell Rep.* 2021;34(6).
415. Cohen KW, Linderman SL, Moodie Z, et al. Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells. *Cell Rep Med.* 2021;2(7).
416. Jung JH, Rha MS, Sa M, et al. SARS-CoV-2-specific T cell memory is sustained in COVID-19 convalescent patients for 10 months with successful development of stem cell-like memory T cells. *Nat Commun.* 2021;12(1):4043.
417. Tarke A, Sidney J, Kidd CK, et al. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases. *Cell Rep Med.* 2021;2(2):100204.
418. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell.* 2020;183(1):158-168.e14.
419. Saini SK, Hersby DS, Tamhane T, et al. SARS-CoV-2 genome-wide T cell epitope mapping reveals immunodominance and substantial CD8+ T cell activation in COVID-19

patients. *Sci Immunol*. 2021;6(58):eabf7550.

420. Miller JD, Most RG van der, Akondy RS, et al. Human Effector and Memory CD8+ T Cell Responses to Smallpox and Yellow Fever Vaccines. *Immunity*. 2008;28(5):710-722.

421. Zhou R, To KKW, Wong YC, et al. Acute SARS-CoV-2 Infection Impairs Dendritic Cell and T Cell Responses. *Immunity*. 2020;53(4):864-877.e5.

422. Chandran A, Rosenheim J, Nageswaran G, et al. Non-severe SARS-CoV-2 infection is characterised by very early T cell proliferation independent of type 1 interferon responses and distinct from other acute respiratory viruses. Published online April 1, 2021:2021.03.30.21254540.

423. Schub D, Klemis V, Schneitler S, et al. High levels of SARS-CoV-2-specific T cells with restricted functionality in severe courses of COVID-19. *JCI Insight*. 2020;5(20):142167.

424. Riou C, Bruyn E du, Stek C, et al. Relationship of SARS-CoV-2-specific CD4 response to COVID-19 severity and impact of HIV-1 and tuberculosis coinfection. *J Clin Invest*. 2021;131(12).

425. Niessl J, Sekine T, Buggert M. T cell immunity to SARS-CoV-2. *Semin Immunol*. 2021;55:101505.

426. Dan JM, Mateus J, Kato Y, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*. 2021;371(6529):eabf4063.

427. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020;181(7):1489-1501.e15.

428. Breton G, Mendoza P, Hägglöf T, et al. Persistent cellular immunity to SARS-CoV-2 infection. *J Exp Med*. 2021;218(4):e20202515.

429. Le Bert N, Clapham HE, Tan AT, et al. Highly functional virus-specific cellular immune response in asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *J Exp Med*. 2021;218(5):e20202617.

430. Lu Z, Laing ED, Pena DaMata J, et al. Durability of SARS-CoV-2-Specific T-Cell Responses at 12 Months Postinfection. *J Infect Dis*. 2021;224(12):2010-2019.

431. Zuo J, Dowell AC, Pearce H, et al. Robust SARS-CoV-2-specific T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection. *Nat Immunol*. 2021;22(5):620-626.

432. Long QX, Tang XJ, Shi QL, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med*. 2020;26(8):1200-1204.

433. Wang Z, Yang X, Zhong J, et al. Exposure to SARS-CoV-2 generates T-cell memory in the absence of a detectable viral infection. *Nat Commun*. 2021;12(1):1724.

434. Ogebe A, Kronsteiner B, Skelly DT, et al. T cell assays differentiate clinical and

subclinical SARS-CoV-2 infections from cross-reactive antiviral responses. *Nat Commun.* 2021;12(1):2055.

435. Bacher P, Rosati E, Esser D, et al. Low-Avidity CD4<sup>+</sup> T Cell Responses to SARS-CoV-2 in Unexposed Individuals and Humans with Severe COVID-19. *Immunity.* 2020;53(6):1258-1271.e5.

436. Braun J, Loyal L, Frentsch M, et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature.* 2020;587(7833):270-274.

437. Mateus J, Grifoni A, Tarke A, et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science.* 2020;370(6512):89-94.

438. Meckiff BJ, Ramírez-Suástegui C, Fajardo V, et al. Imbalance of Regulatory and Cytotoxic SARS-CoV-2-Reactive CD4<sup>+</sup> T Cells in COVID-19. *Cell.* 2020;183(5):1340-1353.e16.

439. Dykema AG, Zhang B, Woldemeskel BA, et al. Functional characterization of CD4<sup>+</sup> T cell receptors crossreactive for SARS-CoV-2 and endemic coronaviruses. *J Clin Invest.* 2021;131(10).

440. Low JS, Vaqueirinho D, Mele F, et al. Clonal analysis of immunodominance and cross-reactivity of the CD4 T cell response to SARS-CoV-2. *Science.* 2021;372(6548):1336-1341.

441. Nelde A, Bilich T, Heitmann JS, et al. SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition. *Nat Immunol.* 2021;22(1):74-85.

442. Schulien I, Kemming J, Oberhardt V, et al. Characterization of pre-existing and induced SARS-CoV-2-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Nat Med.* 2021;27(1):78-85.

443. Sagar M, Reifler K, Rossi M, et al. Recent endemic coronavirus infection is associated with less-severe COVID-19. *J Clin Invest.* 2021;131(1).

444. Swadling L, Diniz MO, Schmidt NM, et al. Pre-existing polymerase-specific T cells expand in abortive seronegative SARS-CoV-2. *Nature.* 2022;601(7891):110-117.

445. Schenkel JM, Masopust D. Tissue-Resident Memory T Cells. *Immunity.* 2014;41(6):886-897.

446. Isho B, Abe KT, Zuo M, et al. Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients. *Sci Immunol.* 2020;5(52):eabe5511.

447. Seow J, Graham C, Merrick B, et al. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. *Nat Microbiol.* 2020;5(12):1598-1607.

448. Qi H, Liu B, Wang X, Zhang L. The humoral response and antibodies against SARS-CoV-2 infection. *Nat Immunol.* 2022;23(7):1008-1020.

449. Woodruff MC, Ramonell RP, Nguyen DC, et al. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nat Immunol.* 2020;21(12):1506-1516.
450. Wang K, Long QX, Deng HJ, et al. Longitudinal Dynamics of the Neutralizing Antibody Response to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection. *Clin Infect Dis.* 2021;73(3):e531-e539.
451. Wajnberg A, Amanat F, Firpo A, et al. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science.* 2020;370(6521):1227-1230.
452. Kuri-Cervantes L, Pampena MB, Meng W, et al. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci Immunol.* 2020;5(49):eabd7114.
453. Shenoy S. SARS-CoV-2 (COVID-19), viral load and clinical outcomes; lessons learned one year into the pandemic: A systematic review. *World J Crit Care Med.* 2021;10(4):132-150.
454. Russell MW, Moldoveanu Z, Ogra PL, Mestecky J. Mucosal Immunity in COVID-19: A Neglected but Critical Aspect of SARS-CoV-2 Infection. *Front Immunol.* 2020;11:611337.
455. Wang Z, Lorenzi JCC, Muecksch F, et al. Enhanced SARS-CoV-2 neutralization by dimeric IgA. *Sci Transl Med.* 2021;13(577):eabf1555.
456. Cervia C, Nilsson J, Zurbuchen Y, et al. Systemic and mucosal antibody responses specific to SARS-CoV-2 during mild versus severe COVID-19. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;147(2):545-557.e9.
457. Fröberg J, Gillard J, Philipsen R, et al. SARS-CoV-2 mucosal antibody development and persistence and their relation to viral load and COVID-19 symptoms. *Nat Commun.* 2021;12(1):5621.
458. Sterlin D, Mathian A, Miyara M, et al. IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. *Sci Transl Med.* 2021;13(577):eabd2223.
459. Sokal A, Chappert P, Barba-Spaeth G, et al. Maturation and persistence of the anti-SARS-CoV-2 memory B cell response. *Cell.* 2021;184(5):1201-1213.e14.
460. Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JCC, et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature.* 2021;591(7851):639-644.
461. Muecksch F, Weisblum Y, Barnes CO, et al. Affinity maturation of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies confers potency, breadth, and resilience to viral escape mutations. *Immunity.* 2021;54(8):1853-1868.e7.
462. Wang Z, Muecksch F, Schaefer-Babajew D, et al. Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection. *Nature.* 2021;595(7867):426-431.
463. Moriyama S, Adachi Y, Sato T, et al. Temporal maturation of neutralizing antibodies in COVID-19 convalescent individuals improves potency and breadth to circulating SARS-CoV-



2 variants. *Immunity*. 2021;54(8):1841-1852.e4.

464. Turner JS, Kim W, Kalaidina E, et al. SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone marrow plasma cells in humans. *Nature*. 2021;595(7867):421-425.

465. Wang C, van Haperen R, Gutiérrez-Álvarez J, et al. A conserved immunogenic and vulnerable site on the coronavirus spike protein delineated by cross-reactive monoclonal antibodies. *Nat Commun*. 2021;12(1):1715.

466. Pinto D, Sauer MM, Czudnochowski N, et al. Broad betacoronavirus neutralization by a stem helix-specific human antibody. *Science*. 2021;373(6559):1109-1116.

467. Hastie KM, Li H, Bedinger D, et al. Defining variant-resistant epitopes targeted by SARS-CoV-2 antibodies: A global consortium study. *Science*. 2021;374(6566):472-478.

468. Barnes CO, Jette CA, Abernathy ME, et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies. *Nature*. 2020;588(7839):682-687.

469. Tortorici MA, Czudnochowski N, Starr TN, et al. Broad sarbecovirus neutralization by a human monoclonal antibody. *Nature*. 2021;597(7874):103-108.

470. Yuan M, Wu NC, Zhu X, et al. A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science*. 2020;368(6491):630-633.

471. He WT, Musharrafieh R, Song G, et al. Targeted isolation of diverse human protective broadly neutralizing antibodies against SARS-like viruses. *Nat Immunol*. 2022;23(6):960-970.

472. Graham C, Seow J, Huettner I, et al. Neutralization potency of monoclonal antibodies recognizing dominant and subdominant epitopes on SARS-CoV-2 Spike is impacted by the B.1.1.7 variant. *Immunity*. 2021;54(6):1276-1289.e6.

473. Suryadevara N, Shrihari S, Gilchuk P, et al. Neutralizing and protective human monoclonal antibodies recognizing the N-terminal domain of the SARS-CoV-2 spike protein. *Cell*. 2021;184(9):2316-2331.e15.

474. Chi X, Yan R, Zhang J, et al. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. *Science*. 2020;369(6504):650-655.

475. McCallum M, De Marco A, Lempp FA, et al. N-terminal domain antigenic mapping reveals a site of vulnerability for SARS-CoV-2. *Cell*. 2021;184(9):2332-2347.e16.

476. Lee WS, Selva KJ, Davis SK, et al. Decay of Fc-dependent antibody functions after mild to moderate COVID-19. *Cell Rep Med*. 2021;2(6):100296.

477. Dufloo J, Grzelak L, Staropoli I, et al. Asymptomatic and symptomatic SARS-CoV-2 infections elicit polyfunctional antibodies. *Cell Rep Med*. 2021;2(5):100275.

478. Chen X, Rostad CA, Anderson LJ, et al. The development and kinetics of functional antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) to SARS-CoV-2 spike protein.

*Virology*. 2021;559:1-9.

479. Anand SP, Prévost J, Nayrac M, et al. Longitudinal analysis of humoral immunity against SARS-CoV-2 Spike in convalescent individuals up to 8 months post-symptom onset. *Cell Rep Med*. 2021;2(6):100290.

480. Yu Y, Wang M, Zhang X, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity response to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):346.

481. Lee WS, Wheatley AK, Kent SJ, DeKosky BJ. Antibody-dependent enhancement and SARS-CoV-2 vaccines and therapies. *Nat Microbiol*. 2020;5(10):1185-1191.

482. Iwasaki A, Yang Y. The potential danger of suboptimal antibody responses in COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(6):339-341.

483. Dugan HL, Stamper CT, Li L, et al. Profiling B cell immunodominance after SARS-CoV-2 infection reveals antibody evolution to non-neutralizing viral targets. *Immunity*. 2021;54(6):1290-1303.e7.

484. Pinto D, Park YJ, Beltramello M, et al. Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. *Nature*. 2020;583(7815):290-295.

485. Shrock E, Fujimura E, Kula T, et al. Viral epitope profiling of COVID-19 patients reveals cross-reactivity and correlates of severity. *Science*. 2020;370(6520):eabd4250.

486. Ng KW, Faulkner N, Cornish GH, et al. Preexisting and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans. *Science*. 2020;370(6522):1339-1343.

487. Anderson EM, Goodwin EC, Verma A, et al. Seasonal human coronavirus antibodies are boosted upon SARS-CoV-2 infection but not associated with protection. *Cell*. 2021;184(7):1858-1864.e10.

488. Majdoubi A, Michalski C, O'Connell SE, et al. A majority of uninfected adults show preexisting antibody reactivity against SARS-CoV-2. *JCI Insight*. 6(8):e146316.

489. Tso FY, Lidenge SJ, Peña PB, et al. High prevalence of pre-existing serological cross-reactivity against severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) in sub-Saharan Africa. *Int J Infect Dis IJID*. 2021;102:577-583.

490. Song G, He WT, Callaghan S, et al. Cross-reactive serum and memory B-cell responses to spike protein in SARS-CoV-2 and endemic coronavirus infection. *Nat Commun*. 2021;12(1):2938.

491. Ortega N, Ribes M, Vidal M, et al. Seven-month kinetics of SARS-CoV-2 antibodies and role of pre-existing antibodies to human coronaviruses. *Nat Commun*. 2021;12(1):4740.

492. Guo L, Wang Y, Kang L, et al. Cross-reactive antibody against human coronavirus OC43 spike protein correlates with disease severity in COVID-19 patients: a retrospective study. *Emerg Microbes Infect*. 2021;10(1):664-676.

493. Wang EY, Mao T, Klein J, et al. Diverse functional autoantibodies in patients with COVID-19. *Nature*. 2021;595(7866):283-288.
494. Hansen KE, Arnason J, Bridges AJ. Autoantibodies and common viral illnesses. *Semin Arthritis Rheum*. 1998;27(5):263-271.
495. Rivera-Correa J, Rodriguez A. Divergent Roles of Antiself Antibodies during Infection. *Trends Immunol*. 2018;39(7):515-522.
496. Bonometti R, Sacchi MC, Stobbione P, et al. The first case of systemic lupus erythematosus (SLE) triggered by COVID-19 infection. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(18):9695-9697.
497. Gigli GL, Vogrig A, Nilo A, et al. HLA and immunological features of SARS-CoV-2-induced Guillain-Barré syndrome. *Neurol Sci*. 2020;41(12):3391-3394.
498. Finsterer J, Scorza FA, Fiorini AC. SARS-CoV-2-associated Guillain-Barre syndrome in 62 patients. *Eur J Neurol*. 2021;28(1):e10-e12.
499. Patil NR, Herc ES, Girgis M. Cold agglutinin disease and autoimmune hemolytic anemia with pulmonary embolism as a presentation of COVID-19 infection. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. Published online July 6, 2020:S1658-3876(20)30116-3.
500. Jensen CE, Wilson S, Thombare A, Weiss S, Ma A. Cold agglutinin syndrome as a complication of Covid-19 in two cases. *Clin Infect Pract*. 2020;7:100041.
501. Tracking SARS-CoV-2 variants. <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>.
502. Rambaut A, Holmes EC, O'Toole Á, et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nat Microbiol*. 2020;5(11):1403-1407.
503. Teyssou E, Delagrèverie H, Visseaux B, et al. The Delta SARS-CoV-2 variant has a higher viral load than the Beta and the historical variants in nasopharyngeal samples from newly diagnosed COVID-19 patients. *J Infect*. 2021;83(4):e1-e3.
504. Planas D, Saunders N, Maes P, et al. Considerable escape of SARS-CoV-2 Omicron to antibody neutralization. *Nature*. 2022;602(7898):671-675.
505. Rajah MM, Hubert M, Bishop E, et al. SARS-CoV-2 Alpha, Beta, and Delta variants display enhanced Spike-mediated syncytia formation. *EMBO J*. 2021;40(24):e108944.
506. SARS-CoV-2 variants of concern as of 4 August 2022. European Centre for Disease Prevention and Control.
507. Magazine N, Zhang T, Wu Y, McGee MC, Veggiani G, Huang W. Mutations and Evolution of the SARS-CoV-2 Spike Protein. *Viruses*. 2022;14(3):640.
508. He X, Hong W, Pan X, Lu G, Wei X. SARS-CoV-2 Omicron variant: Characteristics

and prevention. *MedComm*. 2021;2(4):838-845.

509. Sun Y, Lin W, Dong W, Xu J. Origin and evolutionary analysis of the SARS-CoV-2 Omicron variant. *J Biosaf Biosecurity*. 2022;4(1):33-37.

510. Smyth DS, Trujillo M, Gregory DA, et al. Tracking cryptic SARS-CoV-2 lineages detected in NYC wastewater. *Nat Commun*. 2022;13(1):1-9.

511. Mallapaty S. Where did Omicron come from? Three key theories. *Nature*. 2022;602(7895):26-28.

512. Wei C, Shan KJ, Wang W, Zhang S, Huan Q, Qian W. Evidence for a mouse origin of the SARS-CoV-2 Omicron variant. *J Genet Genomics*. 2021;48(12):1111-1121.

513. Wang L, Cheng G. Sequence analysis of the emerging SARS-CoV-2 variant Omicron in South Africa. *J Med Virol*. 2022;94(4):1728-1733.

514. Upadhyay V, Lucas A, Panja S, Miyauchi R, Mallela KMG. Receptor binding, immune escape, and protein stability direct the natural selection of SARS-CoV-2 variants. *J Biol Chem*. 2021;297(4).

515. Planas D, Veyer D, Baidaliuk A, et al. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature*. 2021;596(7871):276-280.

516. Shen L, Triche TJ, Bard JD, Biegel JA, Judkins AR, Gai X. Spike Protein NTD mutation G142D in SARS-CoV-2 Delta VOC lineages is associated with frequent back mutations, increased viral loads, and immune evasion. Published online September 15, 2021:2021.09.12.21263475.

517. Meng B, Kemp SA, Papa G, et al. Recurrent emergence of SARS-CoV-2 spike deletion H69/V70 and its role in the Alpha variant B.1.1.7. *Cell Rep*. 2021;35(13):109292.

518. Zhang L, Jackson CB, Mou H, et al. SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity. *Nat Commun*. 2020;11(1):6013.

519. Gobeil SMC, Janowska K, McDowell S, et al. D614G Mutation Alters SARS-CoV-2 Spike Conformation and Enhances Protease Cleavage at the S1/S2 Junction. *Cell Rep*. 2021;34(2):108630.

520. Khateeb J, Li Y, Zhang H. Emerging SARS-CoV-2 variants of concern and potential intervention approaches. *Crit Care Lond Engl*. 2021;25(1):244.

521. Nguyen TT, Pathirana PN, Nguyen T, et al. Genomic mutations and changes in protein secondary structure and solvent accessibility of SARS-CoV-2 (COVID-19 virus). *Sci Rep*. 2021;11(1):3487.

522. Wu H, Xing N, Meng K, et al. Nucleocapsid mutations R203K/G204R increase the infectivity, fitness, and virulence of SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe*. 2021;29(12):1788-1801.e6.

523. Zhu Z, Liu G, Meng K, Yang L, Liu D, Meng G. Rapid Spread of Mutant Alleles in Worldwide SARS-CoV-2 Strains Revealed by Genome-Wide Single Nucleotide Polymorphism and Variation Analysis. *Genome Biol Evol.* 2021;13(2):evab015.
524. Lin JW, Tang C, Wei HC, et al. Genomic monitoring of SARS-CoV-2 uncovers an Nsp1 deletion variant that modulates type I interferon response. *Cell Host Microbe.* 2021;29(3):489-502.e8.
525. Safiabadi Tali SH, LeBlanc JJ, Sadiq Z, et al. Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. *Clin Microbiol Rev.* 2021;34(3):e00228-20.
526. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. <https://www.who.int/publications/i/item/10665-331501>
527. Mustafa Hellou M, Górska A, Mazzaferri F, et al. Nucleic acid amplification tests on respiratory samples for the diagnosis of coronavirus infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2021;27(3):341-351.
528. Tsang NNY, So HC, Ng KY, Cowling BJ, Leung GM, Ip DKM. Diagnostic performance of different sampling approaches for SARS-CoV-2 RT-PCR testing: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2021;21(9):1233-1245.
529. Yu F, Yan L, Wang N, et al. Quantitative Detection and Viral Load Analysis of SARS-CoV-2 in Infected Patients. *Clin Infect Dis.* 2020;71(15):793-798.
530. Weiss A, Jellingsø M, Sommer MOA. Spatial and temporal dynamics of SARS-CoV-2 in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *EBioMedicine.* 2020;58:102916.
531. Pray IW, Ford L, Cole D, et al. Performance of an Antigen-Based Test for Asymptomatic and Symptomatic SARS-CoV-2 Testing at Two University Campuses - Wisconsin, September-October 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2021;69(5152):1642-1647.
532. Drain PK, Bemer M, Morton JF, et al. Accuracy of 2 Rapid Antigen Tests During 3 Phases of SARS-CoV-2 Variants. *JAMA Netw Open.* 2022;5(8):e2228143.
533. Hammond J, Leister-Tebbe H, Gardner A, et al. Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with Covid-19. *N Engl J Med.* 2022;386(15):1397-1408.
534. Najjar-Debbiny R, Gronich N, Weber G, et al. Effectiveness of Paxlovid in Reducing Severe COVID-19 and Mortality in High Risk Patients. *Clin Infect Dis.* Published online June 2, 2022:ciac443.
535. Hsu A, Granneman GR, Bertz RJ. Ritonavir. *Clin Pharmacokinet.* 1998;35(4):275-291.
536. SFT\_20-Coronavirus\_A4-23\_09\_2020.pdf.

537. Gottlieb RL, Vaca CE, Paredes R, et al. Early Remdesivir to Prevent Progression to Severe Covid-19 in Outpatients. *N Engl J Med.* 2022;386(4):305-315.
538. Chen P, Nirula A, Heller B, et al. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody LY-CoV555 in Outpatients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384(3):229-237.
539. Weinreich DM, Sivapalasingam S, Norton T, et al. REGEN-COV Antibody Combination and Outcomes in Outpatients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;385(23):e81.
540. Dougan M, Nirula A, Azizad M, et al. Bamlanivimab plus Etesevimab in Mild or Moderate Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;385(15):1382-1392.
541. McCreary EK, Bariola JR, Wadas RJ, et al. Association of Subcutaneous or Intravenous Administration of Casirivimab and Imdevimab Monoclonal Antibodies With Clinical Outcomes in Adults With COVID-19. *JAMA Netw Open.* 2022;5(4):e226920.
542. Yamasoba D, Kosugi Y, Kimura I, et al. Neutralisation sensitivity of SARS-CoV-2 omicron subvariants to therapeutic monoclonal antibodies. *Lancet Infect Dis.* 2022;22(7):942-943.
543. Jayk Bernal A, Gomes da Silva MM, Musungaie DB, et al. Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients. *N Engl J Med.* 2022;386(6):509-520.
544. LAGEVRIO (molnupiravir). Haute Autorité de Santé.
545. Clinical management of COVID-19. <https://www.who.int/teams/health-care-readiness/covid-19>
546. Siemieniuk RA, Bartoszko JJ, Zeraatkar D, et al. Drug treatments for covid-19: living systematic review and network meta-analysis. *BMJ.* 2020;370:m2980.
547. Wagner C, Griesel M, Mikolajewska A, et al. Systemic corticosteroids for the treatment of COVID-19. *Cochrane Database Syst Rev.* 2021;8:CD014963.
548. RECOVERY Collaborative Group, Horby P, Lim WS, et al. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384(8):693-704.
549. Biddle K, White J, Sofat N. What is the full potential of baricitinib in treating patients with COVID-19? *Expert Rev Clin Immunol.* 2022;18(6):545-549.
550. RECOVERY Collaborative Group. Baricitinib in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial and updated meta-analysis. *Lancet Lond Engl.* 2022;400(10349):359-368.
551. Alam W, Bizri AR. Efficacy of tocilizumab in COVID-19: A review of the current evidence. *Sci Prog.* 2021;104(3):00368504211030372.
552. Ghosn L, Chaimani A, Evrenoglou T, et al. Interleukin-6 blocking agents for treating COVID-19: a living systematic review. *Cochrane Database Syst Rev.* 2021;3:CD013881.

553. WHO Rapid Evidence Appraisal for COVID-19 Therapies (REACT) Working Group, Shankar-Hari M, Vale CL, et al. Association Between Administration of IL-6 Antagonists and Mortality Among Patients Hospitalized for COVID-19: A Meta-analysis. *JAMA*. 2021;326(6):499-518.
554. Rosas IO, Bräu N, Waters M, et al. Tocilizumab in Hospitalized Patients with Severe Covid-19 Pneumonia. *N Engl J Med*. 2021;384(16):1503-1516.
555. Stone JH, Frigault MJ, Serling-Boyd NJ, et al. Efficacy of Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;383(24):2333-2344.
556. WHO – COVID19 Vaccine Tracker. <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>.
557. Cai Y, Zhang J, Xiao T, et al. Structural basis for enhanced infectivity and immune evasion of SARS-CoV-2 variants. *Science*. 2021;373(6555):642-648.
558. Teijaro JR, Farber DL. COVID-19 vaccines: modes of immune activation and future challenges. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(4):195-197.
559. Corbett KS, Edwards DK, Leist SR, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature*. 2020;586(7830):567-571.
560. Buschmann MD, Carrasco MJ, Alishetty S, Paige M, Alameh MG, Weissman D. Nanomaterial Delivery Systems for mRNA Vaccines. *Vaccines*. 2021;9(1):65.
561. Heinz FX, Stiasny K. Distinguishing features of current COVID-19 vaccines: knowns and unknowns of antigen presentation and modes of action. *Npj Vaccines*. 2021;6(1):1-13.
562. Zhu FC, Guan XH, Li YH, et al. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Lond Engl*. 2020;396(10249):479-488.
563. Mercado NB, Zahn R, Wegmann F, et al. Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature*. 2020;586(7830):583-588.
564. van Doremalen N, Lambe T, Spencer A, et al. ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. *Nature*. 2020;586(7830):578-582.
565. Logunov DY, Dolzhikova IV, Zubkova OV, et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet Lond Engl*. 2020;396(10255):887-897.
566. Almuqrin A, Davidson AD, Williamson MK, et al. SARS-CoV-2 vaccine ChAdOx1 nCoV-19 infection of human cell lines reveals low levels of viral backbone gene transcription alongside very high levels of SARS-CoV-2 S glycoprotein gene transcription. *Genome Med*.

2021;13(1):43.

567. Kowarz E, Krutzke L, Külp M, et al. Vaccine-induced COVID-19 mimicry syndrome. *eLife*. 2022;11:e74974.

568. Fausther-Bovendo H, Kobinger GP. Pre-existing immunity against Ad vectors: humoral, cellular, and innate response, what's important? *Hum Vaccines Immunother*. 2014;10(10):2875-2884.

569. Barouch DH, Kik SV, Weverling GJ, et al. International seroepidemiology of adenovirus serotypes 5, 26, 35, and 48 in pediatric and adult populations. *Vaccine*. 2011;29(32):5203-5209.

570. Hotez PJ, Bottazzi ME. Whole Inactivated Virus and Protein-Based COVID-19 Vaccines. *Annu Rev Med*. 2022;73:55-64.

571. Keech C, Albert G, Cho I, et al. Phase 1-2 Trial of a SARS-CoV-2 Recombinant Spike Protein Nanoparticle Vaccine. *N Engl J Med*. 2020;383(24):2320-2332.

572. Naaber P, Tserel L, Kangro K, et al. Dynamics of antibody response to BNT162b2 vaccine after six months: a longitudinal prospective study. *Lancet Reg Health Eur*. 2021;10:100208.

573. Sadarangani M, Marchant A, Kollmann TR. Immunological mechanisms of vaccine-induced protection against COVID-19 in humans. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(8):475-484.

574. Lederer K, Castaño D, Gómez Atria D, et al. SARS-CoV-2 mRNA Vaccines Foster Potent Antigen-Specific Germinal Center Responses Associated with Neutralizing Antibody Generation. *Immunity*. 2020;53(6):1281-1295.e5.

575. Turner JS, O'Halloran JA, Kalaidina E, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccines induce persistent human germinal centre responses. *Nature*. 2021;596(7870):109-113.

576. Thomas SJ, Moreira ED, Kitchin N, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine through 6 Months. *N Engl J Med*. 2021;385(19):1761-1773.

577. Ewer KJ, Barrett JR, Belij-Rammerstorfer S, et al. T cell and antibody responses induced by a single dose of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine in a phase 1/2 clinical trial. *Nat Med*. 2021;27(2):270-278.

578. Alter G, Yu J, Liu J, et al. Immunogenicity of Ad26.COV2.S vaccine against SARS-CoV-2 variants in humans. *Nature*. 2021;596(7871):268-272.

579. Ramasamy MN, Minassian AM, Ewer KJ, et al. Safety and immunogenicity of ChAdOx1 nCoV-19 vaccine administered in a prime-boost regimen in young and old adults (COV002): a single-blind, randomised, controlled, phase 2/3 trial. *Lancet Lond Engl*. 2021;396(10267):1979-1993.

580. Zhang Y, Zeng G, Pan H, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an



inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect Dis.* 2021;21(2):181-192.

581. Zhang Z, Mateus J, Coelho CH, et al. Humoral and cellular immune memory to four COVID-19 vaccines. *Cell.* 2022;185(14):2434-2451.e17.

582. Shen X, Tang H, McDanal C, et al. SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 is susceptible to neutralizing antibodies elicited by ancestral spike vaccines. *Cell Host Microbe.* 2021;29(4):529-539.e3.

583. Ikegame S, Siddiquey MNA, Hung CT, et al. Neutralizing activity of Sputnik V vaccine sera against SARS-CoV-2 variants. *Nat Commun.* 2021;12(1):4598.

584. Madhi SA, Baillie V, Cutland CL, et al. Efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 Covid-19 Vaccine against the B.1.351 Variant. *N Engl J Med.* 2021;384(20):1885-1898.

585. Abdool Karim SS, de Oliveira T. New SARS-CoV-2 Variants - Clinical, Public Health, and Vaccine Implications. *N Engl J Med.* 2021;384(19):1866-1868.

586. Pajon R, Doria-Rose NA, Shen X, et al. SARS-CoV-2 Omicron Variant Neutralization after mRNA-1273 Booster Vaccination. *N Engl J Med.* 2022;386(11):1088-1091.

587. Dejnirattisai W, Huo J, Zhou D, et al. SARS-CoV-2 Omicron-B.1.1.529 leads to widespread escape from neutralizing antibody responses. *Cell.* 2022;185(3):467-484.e15.

588. Garcia-Beltran WF, St Denis KJ, Hoelzemer A, et al. mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant. *Cell.* 2022;185(3):457-466.e4.

589. Keeton R, Tincho MB, Ngomti A, et al. T cell responses to SARS-CoV-2 spike cross-recognize Omicron. *Nature.* 2022;603(7901):488-492.

590. EMA. First adapted COVID-19 booster vaccines recommended for approval in the EU. European Medicines Agency.

591. Commissioner O of the. Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes Moderna, Pfizer-BioNTech Bivalent COVID-19 Vaccines for Use as a Booster Dose. FDA.

592. Pfizer and BioNTech Announce Omicron-Adapted COVID-19 Vaccine Candidates Demonstrate High Immune Response Against Omicron | Pfizer.

593. Moderna's Omicron-Containing Bivalent Booster Candidate, mRNA-1273.214, Demonstrates Significantly Higher Neutralizing Antibody Response Against Omicron Subvariants BA.4/5 Compared To Currently Authorized Booster.

594. Caillard S, Anglicheau D, Matignon M, et al. An initial report from the French SOT COVID Registry suggests high mortality due to COVID-19 in recipients of kidney transplants. *Kidney Int.* 2020;98(6):1549-1558.

595. Zheng Z, Peng F, Xu B, et al. Risk factors of critical & mortal COVID-19 cases: A systematic literature review and meta-analysis. *J Infect*. Published online April 23, 2020.
596. Guan W jie, Ni Z yi, Hu Y, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. Published online February 28, 2020:NEJMoa2002032.
597. Devresse A, De Greef J, Yombi JC, Belkhir L, Goffin E, Kanaan N. Immunosuppression and SARS-CoV-2 Infection in Kidney Transplant Recipients. *Transplant Direct*. 2022;8(3):e1292.
598. Danziger-Isakov L, Blumberg EA, Manuel O, Sester M. Impact of COVID-19 in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*. 2021;21(3):925-937.
599. Herold T, Jurinovic V, Arnreich C, et al. Elevated levels of IL-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;146(1):128-136.e4.
600. Shi Y, Yu X, Zhao H, Wang H, Zhao R, Sheng J. Host susceptibility to severe COVID-19 and establishment of a host risk score: findings of 487 cases outside Wuhan. *Crit Care*. 2020;24(1):108.
601. Li C, Jiang J, Wang F, et al. Longitudinal correlation of biomarkers of cardiac injury, inflammation, and coagulation to outcome in hospitalized COVID-19 patients. *J Mol Cell Cardiol*. 2020;147:74-87.
602. Chen L, Li X, Chen M, Feng Y, Xiong C. The ACE2 expression in human heart indicates new potential mechanism of heart injury among patients infected with SARS-CoV-2. *Cardiovasc Res*. 2020;116(6):1097-1100.
603. Bester J, Matshailwe C, Pretorius E. Simultaneous presence of hypercoagulation and increased clot lysis time due to IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8. *Cytokine*. 2018;110:237-242.
604. Zhang Y, Zhang Z, Wei R, et al. IL (Interleukin)-6 Contributes to Deep Vein Thrombosis and Is Negatively Regulated by miR-338-5p. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(2):323-334.
605. Cronjé HT, Nienaber-Rousseau C, Zandberg L, de Lange Z, Green FR, Pieters M. Fibrinogen and clot-related phenotypes determined by fibrinogen polymorphisms: Independent and IL-6-interactive associations. *PLoS One*. 2017;12(11):e0187712.
606. Bernardo A, Ball C, Nolasco L, Moake JF, Dong J fei. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood*. 2004;104(1):100-106.
607. Caillard S, Chavarot N, Francois H, et al. Clinical Utility of Biochemical Markers for the Prediction of COVID-19–Related Mortality in Kidney Transplant Recipients. *Kidney Int Rep*. 2021;6(10):2689-2693.

608. Chavarot N, Gueguen J, Bonnet G, et al. COVID-19 severity in kidney transplant recipients is similar to nontransplant patients with similar comorbidities. *Am J Transplant.* 2021;21(3):1285-1294.
609. Hadi YB, Naqvi SFZ, Kupec JT, Sofka S, Sarwari A. Outcomes of COVID-19 in Solid Organ Transplant Recipients: A Propensity-matched Analysis of a Large Research Network. *Transplantation.* 2021;105(6):1365-1371.
610. Manuel O, Estabrook M. RNA respiratory viral infections in solid organ transplant recipients: Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant.* 2019;33(9):e13511.
611. Wurtz N, Penant G, Jardot P, Duclos N, La Scola B. Culture of SARS-CoV-2 in a panel of laboratory cell lines, permissivity, and differences in growth profile. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021;40(3):477-484.
612. Milewska A, Kula-Pacurar A, Wadas J, et al. Replication of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Human Respiratory Epithelium. *J Virol.* 2020;94(15):e00957-20.
613. Qutub M, Aldabbagh Y, Mehdawi F, et al. Duration of viable SARS-CoV-2 shedding from respiratory tract in different human hosts and its impact on isolation discontinuation policies revision; a narrative review. *Clin Infect Pract.* 2022;13:100140.
614. Dadras O, Afsahi AM, Pashaei Z, et al. The relationship between COVID-19 viral load and disease severity: A systematic review. *Immun Inflamm Dis.* 2022;10(3):e580.
615. Rabaan AA, Tirupathi R, Sule AA, et al. Viral Dynamics and Real-Time RT-PCR Ct Values Correlation with Disease Severity in COVID-19. *Diagnostics.* 2021;11(6):1091.
616. Chen X, Zhao B, Qu Y, et al. Detectable serum SARS-CoV-2 viral load (RNAemia) is closely correlated with drastically elevated interleukin 6 (IL-6) level in critically ill COVID-19 patients. *Clin Infect Dis.* Published online April 17, 2020.
617. Ram-Mohan N, Kim D, Zudock EJ, et al. SARS-CoV-2 RNAemia Predicts Clinical Deterioration and Extrapulmonary Complications from COVID-19. *Clin Infect Dis.* 2022;74(2):218-226.
618. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet Lond Engl.* 2020;395(10223):497-506.
619. Zheng S, Fan J, Yu F, et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study. *BMJ.* 2020;369.
620. Andersson MI, Arancibia-Carcamo CV, Auckland K, et al. SARS-CoV-2 RNA detected in blood products from patients with COVID-19 is not associated with infectious virus. *Wellcome Open Res.* 2020;5:181.

621. Favà A, Donadeu L, Sabé N, et al. SARS-CoV-2-specific serological and functional T cell immune responses during acute and early COVID-19 convalescence in solid organ transplant patients. *Am J Transplant.* 2021;21(8):2749-2761.
622. Predecki M, Clarke C, Gleeson S, et al. Detection of SARS-CoV-2 Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2020;31(12):2753-2756.
623. Hartzell S, Bin S, Benedetti C, et al. Evidence of potent humoral immune activity in COVID-19-infected kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2020;20(11):3149-3161.
624. Cravedi P, Ahearn P, Wang L, et al. Delayed Kinetics of IgG, but Not IgA, Antispike Antibodies in Transplant Recipients following SARS-CoV-2 Infection. *J Am Soc Nephrol.* 2021;32(12):3221-3230.
625. Chavarot N, Leruez-Ville M, Scemla A, et al. Decline and loss of anti-SARS-CoV-2 antibodies in kidney transplant recipients in the 6 months following SARS-CoV-2 infection. *Kidney Int.* 2021;99(2):486-488.
626. Burack D, Pereira MR, Tsapepas DS, et al. Prevalence and predictors of SARS-CoV-2 antibodies among solid organ transplant recipients with confirmed infection. *Am J Transplant.* 2021;21(6):2254-2261.
627. Chang CC, Vlad G, Vasilescu ER, et al. Disparity between levels of anti-RBD IgG and anti-nucleocapsid protein IgG antibodies in COVID-19-recovered patients who received a kidney transplant. *Kidney Int.* 2021;100(1):240-241.
628. Favà A, Donadeu L, Jouve T, et al. A comprehensive assessment of long-term SARS-CoV-2-specific adaptive immune memory in convalescent COVID-19 Solid Organ Transplant recipients. *Kidney Int.* 2022;101(5):1027-1038.
629. Søfteland JM, Gisslén M, Liljeqvist JÅ, et al. Longevity of anti-spike and anti-nucleocapsid antibodies after COVID-19 in solid organ transplant recipients compared to immunocompetent controls. *Am J Transplant.* 2022;22(4):1245-1252.
630. Bertrand D, Hamzaoui M, Drouot L, et al. SARS-CoV-2-specific Humoral and Cellular Immunities in Kidney Transplant Recipients and Dialyzed Patients Recovered From Severe and Nonsevere COVID-19. *Transplant Direct.* 2021;7(12):e792.
631. Stratégie de vaccination contre le SARS-CoV-2 - Vaccination prioritaire de l'entourage des personnes immunodéprimées contre le SARS-Cov 2. Haute Autorité de Santé.
632. Boyarsky BJ, Werbel WA, Avery RK, et al. Antibody Response to 2-Dose SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Series in Solid Organ Transplant Recipients. *JAMA.* 2021;325(21):2204.
633. Rozen-Zvi B, Yahav D, Agur T, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 mRNA vaccine among kidney transplant recipients: a prospective cohort study. *Clin Microbiol Infect.* 2021;27(8):1173.e1-1173.e4.

634. Les avis du Conseil d'orientation de la stratégie vaccinale - Ministère de la Santé et de la Prévention.
635. Kamar N, Abravanel F, Marion O, Couat C, Izopet J, Del Bello A. Three Doses of an mRNA Covid-19 Vaccine in Solid-Organ Transplant Recipients. *N Engl J Med.* 2021;385(7):661-662.
636. Hall VG, Ferreira VH, Ku T, et al. Randomized Trial of a Third Dose of mRNA-1273 Vaccine in Transplant Recipients. *N Engl J Med.* 2021;385(13):1244-1246.
637. Gallais F, Gantner P, Bruel T, et al. Evolution of antibody responses up to 13 months after SARS-CoV-2 infection and risk of reinfection. *EBioMedicine.* 2021;71:103561.
638. Feng S, Phillips DJ, White T, et al. Correlates of protection against symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat Med.* 2021;27(11):2032-2040.
639. Predecki M, Clarke C, Brown J, et al. Effect of previous SARS-CoV-2 infection on humoral and T-cell responses to single-dose BNT162b2 vaccine. *The Lancet.* 2021;397(10280):1178-1181.
640. Goel RR, Apostolidis SA, Painter MM, et al. Distinct antibody and memory B cell responses in SARS-CoV-2 naïve and recovered individuals following mRNA vaccination. *Sci Immunol.* 2021;6(58):eabi6950.
641. Archives DGS-Urgent - Ministère de la Santé et de la Prévention.
642. Marion O, Del Bello A, Abravanel F, et al. Safety and Immunogenicity of Anti-SARS-CoV-2 Messenger RNA Vaccines in Recipients of Solid Organ Transplants. *Ann Intern Med.* 2021;174(9):1336-1338.
643. Cucchiari D, Egri N, Bodro M, et al. Cellular and humoral response after MRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2021;21(8):2727-2739.
644. Del Bello A, Abravanel F, Marion O, et al. Efficiency of a boost with a third dose of anti-SARS-CoV-2 messenger RNA-based vaccines in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant.* n/a(n/a).
645. Masset C, Kerleau C, Garandeau C, et al. A third injection of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in kidney transplant recipients improves the humoral immune response. *Kidney Int.* 2021;100(5):1132-1135.
646. Bertrand D, Hamzaoui M, Lemée V, et al. Antibody and T-cell response to a third dose of SARS-CoV-2 mRNA BNT162b2 vaccine in kidney transplant recipients. *Kidney Int.* 2021;100(6):1337-1340.
647. Kamar N, Abravanel F, Marion O, et al. Assessment of 4 Doses of SARS-CoV-2 Messenger RNA-Based Vaccine in Recipients of a Solid Organ Transplant. *JAMA Netw Open.* 2021;4(11):e2136030.

648. Caillard S, Chavarot N, Bertrand D, et al. Occurrence of severe COVID-19 in vaccinated transplant patients. *Kidney Int.* 2021;100(2):477-479.
649. Zahradka I, Petr V, Modos I, Magicova M, Dusek L, Viklicky O. Association Between SARS-CoV-2 Messenger RNA Vaccines and Lower Infection Rates in Kidney Transplant Recipients. *Ann Intern Med.* 2022;175(7):961-968.
650. Dimeglio C, Herin F, Martin-Blondel G, Miedougé M, Izopet J. Antibody titers and protection against a SARS-CoV-2 infection. *J Infect.* Published online September 21, 2021.
651. Galmiche S, Luong Nguyen LB, Tartour E, et al. Immunological and clinical efficacy of COVID-19 vaccines in immunocompromised populations: a systematic review. *Clin Microbiol Infect.* 2022;28(2):163-177.
652. Sattler A, Schrezenmeier E, Weber UA, et al. Impaired humoral and cellular immunity after SARS-CoV-2 BNT162b2 (tozinameran) prime-boost vaccination in kidney transplant recipients. *J Clin Invest.* 2021;131(14).
653. Chavarot N, Ouedrani A, Marion O, et al. Poor Anti-SARS-CoV-2 Humoral and T-cell Responses After 2 Injections of mRNA Vaccine in Kidney Transplant Recipients Treated With Belatacept. *Transplantation.* 2021;105(9):e94.
654. Ou MT, Boyarsky BJ, Chiang TPY, et al. Immunogenicity and Reactogenicity After SARS-CoV-2 mRNA Vaccination in Kidney Transplant Recipients Taking Belatacept. *Transplantation.* 2021;105(9):2119-2123.
655. Abravanel F, Marion O, Del Bello A, et al. Humoral and Cellular Immune Responses of Solid Organ Transplant Patients on Belatacept to Three Doses of mRNA-Based Anti-SARS-CoV-2 Vaccine. *Vaccines.* 2022;10(3):354.
656. Connolly CM, Chiang TPY, Boyarsky BJ, et al. Temporary hold of mycophenolate augments humoral response to SARS-CoV-2 vaccination in patients with rheumatic and musculoskeletal diseases: a case series. *Ann Rheum Dis.* Published online September 23, 2021.
657. Kantauskaite M, Müller L, Kolb T, et al. Intensity of mycophenolate mofetil treatment is associated with an impaired immune response to SARS-CoV-2 vaccination in kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* n/a(n/a).
658. Charmetant X, Espi M, Benotmane I, et al. Infection or a third dose of mRNA vaccine elicits neutralizing antibody responses against SARS-CoV-2 in kidney transplant recipients. *Sci Transl Med.* 2022;14(636):eabl6141.
659. Hod T, Ben-David A, Olmer L, et al. Humoral Response of Renal Transplant Recipients to the BNT162b2 SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Using Both RBD IgG and Neutralizing Antibodies. *Transplantation.* 2021;105(11):e234.
660. Yahav D, Rozen-Zvi B, Mashraki T, et al. Immunosuppression reduction when administering a booster dose of the BNT162b2 mRNA SARS-CoV-2 vaccine in kidney

transplant recipients without adequate humoral response following two vaccine doses: protocol for a randomised controlled trial (BECAME study). *BMJ Open*. 2021;11(10):e055611.

661. Benning L, Morath C, Kühn T, et al. Humoral response to SARS-CoV-2 mRNA vaccination in previous non-responder kidney transplant recipients after short-term withdrawal of mycophenolic acid. *Front Med*. 2022;9.

662. Noble J, Langelo A, Bouchut W, Lupo J, Lombardo D, Rostaing L. Immune Response Post-SARS-CoV-2 mRNA Vaccination in Kidney Transplant Recipients Receiving Belatacept. *Transplantation*. 2021;105(11):e259.

663. Seija M, Rammauro F, Noboa J, et al. Humoral Response to Heterologous SARS-CoV-2 Vaccination in Kidney Transplant Patients Is Heterogeneous and Dose Dependent. *Kidney Int Rep*. 2022;7(8):1887-1892.

664. Medina-Pestana J, Almeida Viana L, Nakamura MR, et al. Immunogenicity After a Heterologous BNT262b2 Versus Homologous Booster in Kidney Transplant Recipients Receiving 2 Doses of CoronaVac Vaccine: A Prospective Cohort Study. *Transplantation*. Published online August 5, 2022.

665. Reindl-Schwaighofer R, Heinzl A, Mayrdorfer M, et al. Comparison of SARS-CoV-2 Antibody Response 4 Weeks After Homologous vs Heterologous Third Vaccine Dose in Kidney Transplant Recipients: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med*. 2022;182(2):165-171.

666. Alejo JL, Mitchell J, Chiang TPY, et al. Six-month Antibody Kinetics and Durability in SARS-CoV-2 mRNA Vaccinated Solid Organ Transplant Recipients. *Transplantation*. 2022;106(1):e109.

667. Boyarsky BJ, Chiang TPY, Teles AT, et al. Antibody Kinetics and Durability in SARS-CoV-2 mRNA Vaccinated Solid Organ Transplant Recipients. *Transplantation*. 2021;105(10):e137.

668. Kamar N, Abravanel F, Marion O, et al. Anti-SARS-CoV-2 spike protein and neutralizing antibodies at 1 and 3 months after three doses of SARS-CoV-2 vaccine in a large cohort of solid organ transplant patients. *Am J Transplant*. 2022;22(5):1467-1474.

# Annexes

**Principales publications sur la thématique concernant le BKPyV et le SARS-CoV-2  
chez le transplanté rénal**





# Intravenous Immunoglobulin Administration Significantly Increases BKPyV Genotype-Specific Neutralizing Antibody Titers in Kidney Transplant Recipients

Auréli Velay,<sup>a,b,d</sup> Morgane Solis,<sup>a,b,d</sup> Ilies Benotmane,<sup>b,c,d</sup> Pierre Gantner,<sup>a,b,d</sup> Eric Soulier,<sup>a,b,d</sup> Bruno Moulin,<sup>b,c,d</sup> Sophie Caillard,<sup>b,c,d</sup> Samira Fafi-Kremer<sup>a,b,d</sup>

<sup>a</sup>Virology Laboratory, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

<sup>b</sup>Strasbourg University, INSERM, IRM UMR-S 1109, Strasbourg, France

<sup>c</sup>Nephrology Department, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

<sup>d</sup>Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, France

**ABSTRACT** BK polyomavirus (BKPyV)-associated nephropathy (BKPyVAN) is one of the major causes of kidney graft dysfunction, and there are no BKPyV-specific antiviral therapies available. BKPyV neutralizing antibodies (NAbs) play key roles in protecting against BKPyV replication and represent a potential therapeutic or preventive strategy. In this study, we evaluated NAb titers in intravenous immunoglobulin (i.v. Ig) preparations and in kidney transplant recipients (KTR) before and after i.v. Ig administration. NAb titers directed against major BKPyV genotypes were measured using a BKPyV pseudovirion system. Thirty-three KTR receiving high (1 g/kg of body weight/day;  $n = 17$ ) or low (0.4 g/kg/day;  $n = 16$ ) i.v. Ig doses were included. Median NAb titers in i.v. Ig preparations ranged from 5.9 log<sub>10</sub> 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) for genotype I to 4.1 log<sub>10</sub> IC<sub>50</sub> for genotype IV. A mean of 90% of patients (range, 88% to 100%) displaying low or negative BKPyV NAb titers against genotype I reached 4 log<sub>10</sub> IC<sub>50</sub> after the first i.v. Ig administration. This value was reached by a mean of 44% (range, 13% to 83%) and 19% (range, 0% to 38%) of patients against genotype II and genotype IV, respectively. The benefit of i.v. Ig administration persisted until the following course of treatment (day 22 ± 7 days) for genotypes I and II, and no cumulative effect was observed through the three doses. Our findings demonstrate that i.v. Ig administration results in a significant increase in BKPyV NAb titers in KTR. These *in vitro* and *in vivo* pharmacokinetic data provide the rationale for a proof-of-concept study investigating the efficacy of i.v. Ig for the prevention of BKPyV infection in KTR.

**KEYWORDS** BK nephropathy, BK virus, intravenous immunoglobulin, kidney transplantation, viral infection

**B**K polyomavirus (BKPyV)-associated nephropathy (BKPyVAN), one of the worrisome causes of kidney graft dysfunction, is a growing medical problem as the population of transplant recipients continues to increase (1, 2). BKPyVAN arises from the use of highly potent immunosuppressive drugs (3–5). Disruption of the balance between BKPyV replication and host immune control is generally viewed as a key element of viral pathogenesis (6). BKPyV replication occurs in 40% to 50% of kidney transplant recipients (KTR), followed by BKPyVAN in up to 10% of KTR (7). When nephropathy develops, it leads to graft dysfunction and graft loss in up to 50% of patients (7, 8).

At present, there are no available BKPyV-specific antiviral therapies. A range of therapeutic agents have been studied for the ability to treat polyomavirus infections, including leflunomide, quinolones, and cidofovir, with variable success (9). Limited

**Citation** Velay A, Solis M, Benotmane I, Gantner P, Soulier E, Moulin B, Caillard S, Fafi-Kremer S. 2019. Intravenous immunoglobulin administration significantly increases BKPyV genotype-specific neutralizing antibody titers in kidney transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e00393-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00393-19>.

**Copyright** © 2019 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Samira Fafi-Kremer, samira.fafi-kremer@unistra.fr.

**Received** 22 February 2019

**Returned for modification** 20 March 2019

**Accepted** 21 May 2019

**Accepted manuscript posted online** 3 June 2019

**Published** 25 July 2019

treatment modalities exist, and the most widely accepted intervention is reduction of immunosuppressive therapy after confirmation or presumption of BKPyVAN (10, 11). Unfortunately, this approach is not always successful and increases the risk of acute rejection (5% to 25%) and donor-specific antibody (DSA) emergence (12, 13). Given the incomplete success of preemptive and supportive strategies for BKPyV-associated diseases, there is an urgent need to develop anti-BKPyV therapies. Human intravenous immunoglobulin (i.v. Ig) forms the basis of immunopreventive and immunotherapeutic strategies against many important human viral infections (14–18). Randhawa et al. demonstrated that commercial preparations of i.v. Ig (Privigen and Cytogam) contain potent neutralizing antibodies that are capable of neutralizing all major BKPyV genotypes *in vitro* (19). In a recent study, we showed that BKPyV neutralizing antibodies (NAbs) play a key role in protection against BKPyV replication in kidney transplant recipients (20). A NAb titer against the donor's strain lower than  $4 \log_{10}$  50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) before transplantation was significantly associated with BKPyV replication after transplantation (hazard ratio [HR] = 1.88; 95% confidence interval [CI] = 1.06 to 3.45;  $P = 0.03$ ). Taken together, these data suggest that i.v. Ig administration may help to prevent BKPyV replication *in vivo*. In this study, we evaluated the capacities of three commercial i.v. Ig preparations (Privigen, Clairyg, and Octagam) to increase BKPyV NAb titers *in vivo* in KTR treated with low (0.4 g/kg of body weight/day) or high (1 g/kg/day) i.v. Ig doses.

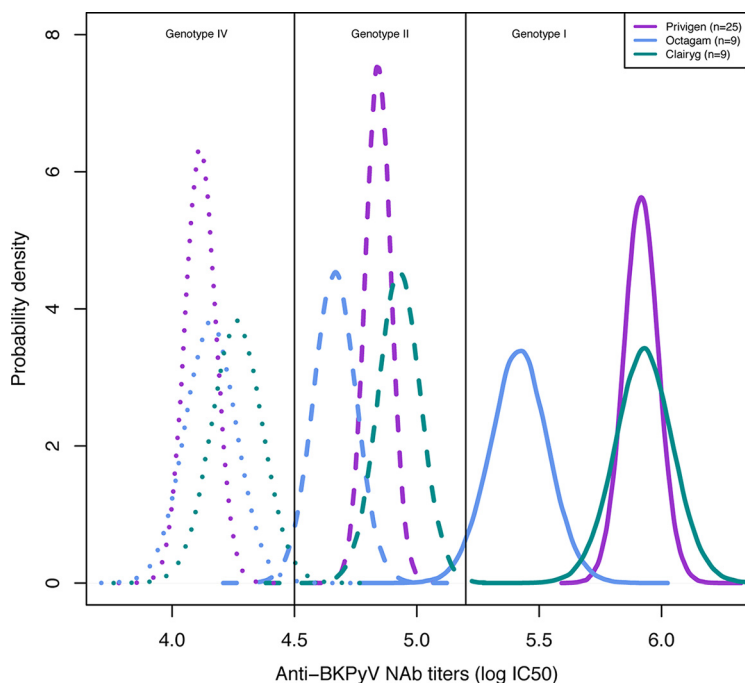
## RESULTS

**High titers of BKPyV genotype-specific NAbs in i.v. Ig preparations.** Forty-three commercial i.v. Ig batches were tested: Privigen,  $n = 25$ ; Octagam,  $n = 9$ ; and Clairyg,  $n = 9$  (see Tables S1, S2, and S3 in the supplemental material). All the i.v. Ig preparations tested contained NAbs against the three major BKPyV genotypes. The NAb titers ranged from 5.1 to 6.7  $\log_{10}$   $IC_{50}$  against genotype I, from 4.4 to 5.5  $\log_{10}$   $IC_{50}$  against genotype II, and from 3.6 to 4.8  $\log_{10}$   $IC_{50}$  against genotype IV. In agreement with the results of the Kruskal-Wallis tests (see Fig. S1A, B, and C in the supplemental material), Bayesian modeling of the posterior distributions of the NAb titers according to the BKPyV genotype and commercial preparation showed a 99% probability that the NAb titers were higher for genotype I than for genotype II or genotype IV (Fig. 1). Octagam showed lower BKPyV NAb titers against genotype I ( $-0.5 \log_{10}$ ) than Clairyg or Privigen, with a probability of 96% (Fig. 1).

All the batches were tested in triplicate, and variations within the same i.v. Ig batch were evaluated by calculating the mean intrabatch coefficient of variation (CV). All of the commercial preparations showed intrabatch CV lower than 10% for the tested BKPyV genotypes. Batch-to-batch variations within manufacturers were also evaluated (see Tables S1, S2, and S3) and showed CV lower than 10%.

The neutralizing effect of i.v. Ig (Privigen) was confirmed in a culture system of human renal proximal tubule epithelial cells (hRPTEC) infected by infectious BKPyV strains (genotype I, genotype II, or genotype IV). A final 1/100,000 dilution of i.v. Ig led to mean inhibition rates of 87% for genotypes I and II and 80% for genotype IV (see Fig. S2A and B in the supplemental material).

**KTR sera post-i.v. Ig administration efficiently neutralize BKPyV genotypes.** Thirty-three KTR were enrolled in the study, including 17 treated with 1 g/kg/day i.v. Ig for 2 days every 3 weeks ( $\pm 7$  days) for antibody-mediated rejection (AMR group;  $n = 17$ ) and 16 treated with 0.4 g/kg/day i.v. Ig for secondary immunodeficiency syndrome (SIDS group;  $n = 16$ ) every 3 weeks ( $\pm 7$  days). Patients' characteristics are described in Table 1 for both the AMR and the SIDS groups. Patients who received high doses of i.v. Ig for AMR or low doses for SIDS displayed low urinary protein excretion. The median proteinuria/creatinuria ratios were about 0.21 g/g (range, 0.07 to 0.81 g/g) and 0.45 g/g (range, 0.12 to 1.85 g/g) in AMR and SIDS patients, respectively. Only two patients in the SIDS group displayed proteinuria/creatinuria ratios above 1 g/g. IgG levels were available for most of the patients before i.v. Ig infusion, with a median of 6.4 g/liter (range, 2.2 to 11.5 g/liter). After i.v. Ig infusion, IgG levels were available mostly for SIDS



**FIG 1** Posterior distributions of the BKPyV NAb titers according to the genotype and commercial preparation by Bayesian modeling. The density of Pr describes the continuous probability distribution of the BKPyV NAb titers according to the genotype and commercial preparation. The BKPyV NAb titer distribution values are depicted according to the BKPyV genotype (I, II, and IV) and for each commercial preparation (Privigen, Octagam, and Clairryg). There was no overlap between genotypes, reflecting higher titers for genotype I, followed by genotype II and genotype IV, for each commercial preparation. The highest anti-BKPyV genotype I NAb titers were obtained for Privigen and Clairryg.

patients, with a median of 8.9 g/liter (range, 7 to 11.7 g/liter). BKPyV DNA load monitoring was performed monthly for all patients for up to 12 months of follow-up, every 3 months during the second year after transplantation, and then every 6 months. During this period, no patient displayed BKPyV replication in the group receiving high doses of i.v. Ig. Among those receiving low doses of i.v. Ig, 3 out of 16 developed BKPyV viremia: 1 patient who was highly immunosuppressed developed transient viremia (56 days); 2 patients remained viruric. Among them, one patient harbored a BKPyV of genotype II, for which i.v. Ig is hardly efficient.

At day 0, NAb titers against each BKPyV genotype were similar between the AMR and the SIDS groups (*P* value = 0.16 for genotype I; *P* value = 0.14 for genotype II; *P* value = 0.08 for genotype IV; Mann-Whitney test,  $\alpha = 5\%$ ). Overall, the percentages of patients displaying BKPyV NAb titers lower than 4 log<sub>10</sub> IC<sub>50</sub> were 64% (21/33) for genotype I and 91% (30/33) for genotype II and genotype IV. Among these patients, 9.5% (2/21) showed negative BKPyV NAb titers (<2.5 log<sub>10</sub> IC<sub>50</sub>) against genotype I,

**TABLE 1** Patients' characteristics<sup>a</sup>

Characteristic	Value for patients with i.v. Ig for:	
	AMR (n = 17)	SIDS (n = 16)
Median age (yr) (range)	42.2 (18.0–72.6)	58.3 (17.7–69.5)
Male [n (%)]	9 (52.9)	12 (75)
1st graft [n (%)]	15 (88)	16 (100)
Living donor [n (%)]	2 (12)	4 (25)
No. of HLA mismatches [mean (range)]	3.4 (1–5)	3.9 (0–6)
Delay (mo) between graft and first i.v. Ig injection [median (range)]	19.1 (0.8–134.7)	0.8 (0.7–1.6)

<sup>a</sup>Patient cohort, n = 33.

33% (10/30) against genotype II, and 53% (16/30) against genotype IV (see Tables S4, S5, and S6 in the supplemental material).

Analysis of NAb titers the day after the first injection (day 1) in the AMR group showed a median increase of  $+1.3 \log_{10} \text{IC}_{50}$  (range, 0.5 to 1.8) for genotype I,  $+0.9 \log_{10} \text{IC}_{50}$  (range, 0.2 to 2.4) for genotype II, and  $+1.1 \log_{10} \text{IC}_{50}$  (range, 0.2 to 2.5) for genotype IV (see Tables S4, S5, and S6). In the SIDS group, the NAb titer increase was  $+1.3 \log_{10} \text{IC}_{50}$  (range, 0.4 to 2.0) for genotype I,  $+0.9 \log_{10} \text{IC}_{50}$  (range, 0 to 1.1) for genotype II, and  $+0.3 \log_{10} \text{IC}_{50}$  (range, 0 to 1.0) for genotype IV (see Tables S4, S5, and S6). Subsequent to the first injection, 90% (19/21) of patients reached a NAb titer of at least  $4 \log_{10} \text{IC}_{50}$  against genotype I, including 100% of the patients in the AMR group and 88% in the SIDS group; 44% (12/27) against genotype II, including 83% (10/12) in the AMR group versus 13% (2/15) in the SIDS group; and 18.5% (5/27) against genotype IV, including 38% (5/13) in the AMR group and no patients (0/14) in the SIDS group. According to Bayesian modeling of the posterior distributions of the NAb titers before and after i.v. Ig injection, the observed increases were not relevantly different between the two groups for genotype I (probability of a  $0.5 \log_{10}$  increase [Pr],  $>0.75$ ). However, this increase was higher in the AMR group than in the SIDS group for both genotype II (Pr = 0.92 versus 0.05, respectively) and genotype IV (Pr = 0.94 versus 0, respectively) (Fig. 2).

In both AMR and SIDS patients, BKPyV NAb titers against genotypes I and II remained stable over two i.v. Ig injections (Fig. 3). The decrease observed was lower than or equal to  $-0.5 \log_{10} \text{IC}_{50}$  (for genotype I, the AMR median was  $-0.5 \log_{10} \text{IC}_{50}$  and the SIDS median was  $-0.4 \log_{10} \text{IC}_{50}$  [*P* value, 0.44]; for genotype II, the AMR median was  $-0.4 \log_{10} \text{IC}_{50}$ , and the SIDS median was  $-0.3 \log_{10} \text{IC}_{50}$  [*P* value, 0.0925]; Mann-Whitney test,  $\alpha = 5\%$ ).

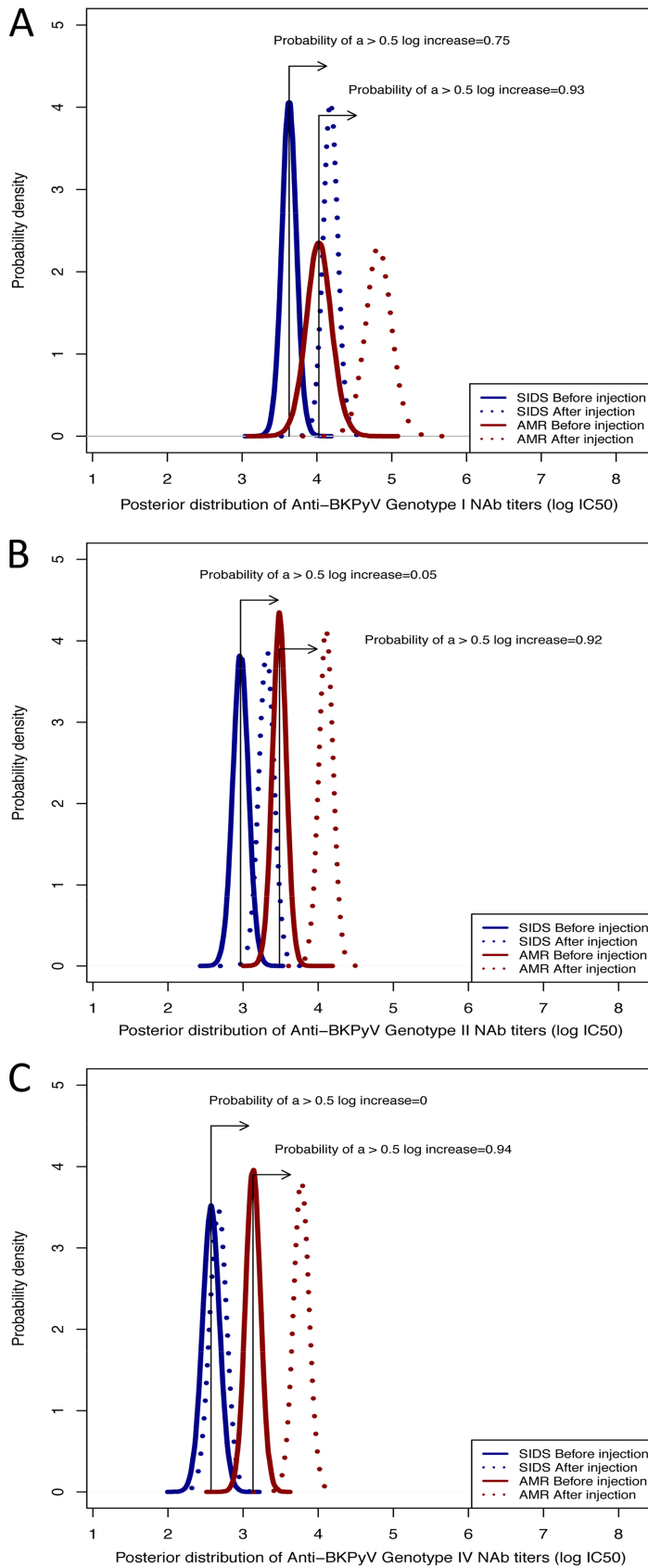
## DISCUSSION

Human i.v. Ig is not only a source of passive immunity, but also a powerful immunomodulatory and anti-inflammatory agent. These molecules are therefore widely used in solid organ transplantation (i.e., for HLA and ABO blood group antibody desensitization, treatment of AMR, or treatment of SIDS) (21–25).

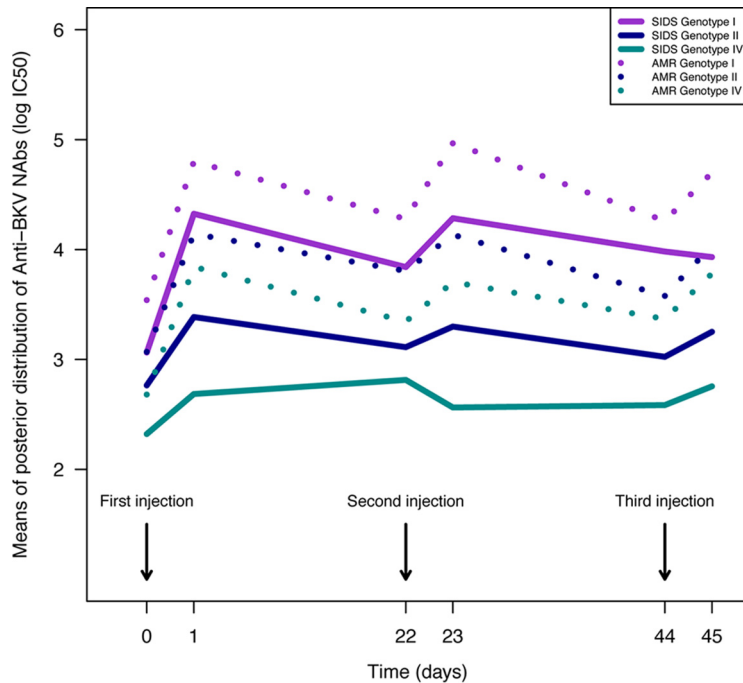
In this study, we showed that (i) i.v. Ig contained high NAb titers against the major BKPyV genotypes, (ii) NAb titers were similar between batches of the same commercial preparation but differed depending on the i.v. Ig supplier, and (iii) i.v. Ig administration increased BKPyV genotype-specific NAb titers in KTR.

The three i.v. Ig types tested contained high NAb titers against BKPyV genotypes I and II and only low titers against genotype IV. Since i.v. Ig preparations are derived from pooled human plasma from thousands of donors, this result may reflect the prevalence of BKPyV genotypes in the healthy population. This is true for BKPyV genotype I, which is known to be the most prevalent. However, NAb titers against BKPyV genotype II were higher than expected. Similar findings were reported by Pastrana et al. in healthy donors and by Randhawa et al. in i.v. Ig, where the genotype II seroprevalence was below that of genotype I but higher than that of genotype IV (19, 26, 27). In a longitudinal study, we also demonstrated that the genotype II seroprevalence in KTR was approximately 10-fold higher than the PCR-based prevalence (28). This difference cannot be explained by the PCR results because our PCR assay was able to detect and adequately quantify all of the BKPyV genotypes (29); the difference also cannot be explained by cross-reactivity because genotypes I and II have low sequence homology in the major NAb epitope, which is the VP1 BC loop. On the other hand, the difference suggests that genotype II may be prone to clearance from the genitourinary tract or have low reactivation potential; further research is warranted to address this observation.

NAb titers were similar between batches but were different between the commercial i.v. Ig preparations. Octagam showed lower NAb titers against genotype I ( $-0.5 \log_{10}$ ) than Privigen and Clairgy. The impacts of the manufacturing techniques and



**FIG 2** Posterior distributions of the BKPyV NAb titers before and after i.v. Ig injection according to the genotype and type of patients by Bayesian modeling. The density of Pr describes the continuous (Continued on next page)



**FIG 3** Dynamics of posterior means of NAB titers over time according to BkPyV genotype in patients receiving successive i.v. Ig administrations. The estimated means of BkPyV NAb titers are depicted according to the BkPyV genotype (I, II, and IV) for both SIDS and AMR patients. There was no cumulative effect of i.v. Ig administration for any genotype.

donor characteristics on the antibody concentrations in the three commercial preparations remain to be determined.

The results of the *in vivo* experiments were consistent with the *in vitro* data. Administration of i.v. Ig either at low (0.4 g/kg/day) or high (1 g/kg/day) doses to KTR significantly increased the BkPyV NAb titers in KTR sera by up to 2.4 log<sub>10</sub> units against genotype I, and only high doses led to NAb titer increases, up to 1 log<sub>10</sub> unit, against genotype II and genotype IV. In KTR, we (20) and others (30) have shown that NAb titers increase after the onset of BkPyV replication and that an early and effective neutralizing response against the replicating strain (mainly of donor origin) prevents the development of viremia. We therefore defined a cutoff value of 4 log<sub>10</sub> IC<sub>50</sub> at transplantation as a protective NAb titer against BkPyV replication, supporting the potential benefit of administering NABs as a preventive strategy against BkPyV infection (20). In the present study, 64% of patients displayed low or negative BkPyV NAb titers against genotype I before i.v. Ig administration, and 90% of these patients reached the value of 4 log<sub>10</sub> IC<sub>50</sub> after the first administration. This value was reached against genotype II in 83% of patients treated with high doses of i.v. Ig and in only 13% of patients treated with low i.v. Ig doses. As expected, only a few treated patients were able to reach the 4 log<sub>10</sub> IC<sub>50</sub> value against genotype IV. These results strongly suggested that i.v. Ig could be used at a dose of 0.4 g/kg/day to reach the cutoff value of 4 log<sub>10</sub> IC<sub>50</sub> for BkPyV NABs against genotype I. Due to their paucity in i.v. Ig preparations, only high doses of i.v. Ig may induce protective NAB titers against genotypes II and IV.

**FIG 2** Legend (Continued)

probability distribution of BkPyV NAb titers before and after i.v. Ig injection according to the genotype and the patient group (AMR or SIDS). The BkPyV NAb titer distribution values are depicted according to the BkPyV genotype (I [A], II [B], and IV [C]) before and after i.v. Ig injection for both SIDS (blue) and AMR (red) patients. The observed NAb titer increases were not relevantly different between the two groups of patients for genotype I (probability of a 0.5 log<sub>10</sub> increase [Pr], >0.75). However, the increase was greater in the AMR group than in the SIDS group for both genotype II (Pr = 0.92 versus 0.05, respectively) and genotype IV (Pr = 0.94 versus 0, respectively).



The benefit of i.v. Ig administration persisted until the next injection (i.e. 22 days  $\pm$  7 days) in the two groups. This lasting effect of i.v. Ig administration for genotype I suggested that one injection per month over the first 3 months posttransplantation could restore humoral protection during this period—the time of highest risk for BKPyV reactivation—and beyond. The beneficial effect of i.v. Ig administration was not maintained for genotype II in the SIDS group and for genotype IV in both the SIDS and AMR groups.

Human i.v. Ig has been used as an empirical therapy against BKPyV infection; however, currently available studies are not easy to evaluate because of the absence of controlled arms. All such studies used i.v. Ig therapy after the occurrence of BKPyV viremia and/or BKPyVAN, associated or not with a concomitant treatment intervention (14–18). To our knowledge, this is the first time that i.v. Ig was considered to be a potential tool to prevent postgraft BKPyV infection in KTR.

In summary, our study has provided *in vitro* and *in vivo* pharmacokinetic data showing that i.v. Ig administration resulted in an increase in BKPyV NAb titers in kidney transplant recipients, reaching a protective threshold for at least two of the three major genotypes. The immunomodulatory effects of i.v. Ig may be beneficial and may provide an optimal balance between rejection and viral reactivation risks. The potential cost of this preventive strategy is estimated to be around €3,000 (for SIDS, in an adult weighing 70 kg). The cost of i.v. Ig therapy could vary greatly according to the country and is closer to \$12,000 in the United States. However, these estimated costs should be considered in comparison to the cost generated by a patient hospitalization due to BKPyV disease complications (around €4,698 [\$6,109] for 1 day of hospitalization) and/or the tremendous cost of graft loss and return to dialysis (31). Overall, although limited by the small sample size (164 samples from 33 patients) and the retrospective design of the study, our findings provide a rationale for a proof-of-concept study investigating the efficacy of i.v. Ig for the prevention of BKPyV infection in kidney transplant recipients.

## MATERIALS AND METHODS

**Study population.** Kidney transplant recipients who were BKPyV seronegative or displayed low NAb titers ( $<4 \log_{10} \text{IC}_{50}$ ) against at least one BKPyV genotype and received i.v. Ig therapy were enrolled in this study. Every 3 weeks ( $\pm 7$  days), all the KTR received a dose of 1 g/kg/day of i.v. Ig over 2 days for AMR proved by allograft biopsy and/or detection of DSAs, or a dose of 0.4 g/kg/day for SIDS. Blood samples were collected in the AMR group before and 1 day after each i.v. Ig administration and in the SIDS group before and 1 to 7 days after each i.v. Ig administration. We assigned day 0, day 22, and day 44 as the days before i.v. Ig administration and day 1, day 23, and day 45 as the days after i.v. Ig administration. BKPyV replication was monitored using BKPyV quantitative real-time PCR (BK Virus R-Gene kit; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) in urine and blood samples collected at the time of transplantation, monthly for all patients for up to 12 months of follow-up, every 3 months during the second year after transplantation, and then every 6 months. To ensure that variations in BKPyV NAb titers were due only to i.v. Ig administration and not to recipient immune humoral responses upon viral reactivation (20), only non-replicative recipients were included in the study. Gamma globulin titers were tested in all KTR at 10 days, 3 months, and 1 year and yearly after transplantation. The research protocol was approved by the institutional review board of Strasbourg University Hospitals under reference number CPP-EST DC-2013-1990.

**I.v. Ig preparations.** Three i.v. Ig preparations (human immunoglobulin derived from healthy human subjects) were tested: (i) Privilgen, 100 mg/ml (CSL Behring GmbH, Marburg, Germany); (ii) Octagam, 100 mg/ml (Octapharma, Lachen, Switzerland); and (iii) Clairigy, 50 mg/ml (LFB-Biomédicaments, Les Ulis, France). Privilgen was used in 30 patients (14 AMR and 16 SIDS), Octagam in 1 patient (AMR), and Clairigy in 2 patients (AMR).

**Neutralization assay.** Neutralization assays were performed using a BKPyV pseudovirion system expressing the capsid proteins of BKPyV genotype I, II, or IV, as previously described (20, 26). The assay enabled the quantification of antibody titers that functionally neutralized the infectivity of the various BKPyV genotypes, each of which is known to be a distinct neutralization serotype (26). BKPyV genotype III was not represented in our study because genotype III represents less than 1% of BKPyV isolates in Europe and several studies have suggested that BKPyV genotypes II and III may belong to the same genotype (20, 32). The neutralization titer was defined as the sample dilution that yielded 50% inhibition of pseudovirion infectivity ( $\text{IC}_{50}$ ) and was expressed as the  $\log_{10}$  of the  $\text{IC}_{50}$ . Sera were considered nonneutralizing if the 1:100 dilution ( $2.0 \log_{10}$ ) did not lead to a reduction of at least 50% of the luminometric signal relative to the control condition without serum or with the negative control (i.e., 50% neutralization of the reporter vector). A neutralization titer of  $2.5 \log_{10} \text{IC}_{50}$  was set as the threshold of antibody-mediated neutralization quantification. To minimize any variation, a single pseudovirion stock

was produced for each genotype, aliquoted, and used for all experiments. The neutralizing effect of i.v. Ig (Privigen) on pseudovirions was confirmed in a culture system that used primary cells (hRPTEC), the infectious BKPyV strain Dunlop (genotype Ia), and patient-derived BKPyV strains (genotype I, genotype II, and genotype IV). The infectivity rates were measured by real-time PCR (Light Cycler 480; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), and the GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gene was used as a reference gene for normalization of the quantitative-PCR data. Each genotype was tested in duplicate, and two sets of experiments were performed.

**Statistical analyses.** Statistical analyses were performed using GraphPad (San Diego, CA, USA) Prism 6 software. The distributions of continuous data were compared using nonparametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests when comparing groups of patients or i.v. Ig preparations, and Wilcoxon signed-rank tests were used for paired comparisons. The distribution of categorical variables was compared using chi-square or Fisher's exact tests.

We used Bayesian methods (33–35) to estimate the posterior probability distribution of the BKPyV NAb titers (mixed linear models) with noninformative priors using two different models aimed at (i) comparing NAb titers against the different BKPyV genotypes in commercial preparations and (ii) assessing the dynamics of individuals' NAb titers over time according to the i.v. Ig dosing and the baseline titer. The probability of a substantially increased NAb titer (i.e., a NAb titer of  $>4 \log_{10} IC_{50}$ ) was calculated from the posterior distributions. Statistical interpretation of the Bayesian analysis was expressed as the probability (Pr) of observing a difference in the NAb titer greater than  $0.5 \log_{10} IC_{50}$  between two commercial preparations, two genotypes, two groups, or two time points. The 0.5 threshold corresponded to the standard deviation of the neutralization assay and was considered clinically relevant. All Bayesian analyses were performed with JAGS using the rjags package in R version 3.1.1.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/AAC.00393-19>.

**SUPPLEMENTAL FILE 1**, PDF file, 0.4 MB.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Christopher B. Buck for expression plasmids for VP1, VP2, and VP3 and the National Cancer Institute Tumor Repository for 293TT cells.

This work was supported by grants from the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (Recherche Non-Interventionnelle [RNI] 2016, no. 6368), the Agence Nationale de la Recherche (ANR), Laboratoire d'Excellence TRANSPLANTE (ANR-11-LABX-0070\_TRANSPLANTE), and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (UMR\_S 1109).

We have no conflicts of interest to disclose.

## REFERENCES

- Hirsch HH, Snydman DR. 2005. BK virus: opportunity makes a pathogen. *Clin Infect Dis* 41:354–360. <https://doi.org/10.1086/431488>.
- Hariharan S. 2006. BK virus nephritis after renal transplantation. *Kidney Int* 69:655–662. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000040>.
- 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* 347:488–496. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020439>.
- Hirsch HH, Randhawa P, AST Infectious Diseases Community of Practice. 2013. BK polyomavirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 13(Suppl 4):179–188. <https://doi.org/10.1111/ajt.12110>.
- Hirsch HH, Vincenti F, Friman S, Tuncer M, Citterio F, Wiecek A, Scheuermann EH, Klinger M, Russ G, Pescovitz MD, Prestele H. 2013. Polyomavirus BK replication in de novo kidney transplant patients receiving tacrolimus or cyclosporine: a prospective, randomized, multicenter study. *Am J Transplant* 13:136–145. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04320.x>.
- Borni-Duval C, Caillard S, Olagne J, Perrin P, Braun-Parvez L, Heibel F, Moulin B. 2013. Risk factors for BK virus infection in the era of therapeutic drug monitoring. *Transplantation* 95:1498–1505. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3182921995>.
- Kuypers DR. 2012. Management of polyomavirus-associated nephropathy in renal transplant recipients. *Nat Rev Nephrol* 8:390–402. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2012.64>.
- Wadei HM, Rule AD, Lewin M, Mahale AS, Khamash HA, Schwab TR, Gloor JM, Textor SC, Fidler ME, Lager DJ, Larson TS, Stegall MD, Cosio FG, Griffin MD. 2006. Kidney transplant function and histological clearance of virus following diagnosis of polyomavirus-associated nephropathy (PVAN). *Am J Transplant* 6:1025–1032. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01296.x>.
- Barth H, Solis M, Lepiller Q, Sueur C, Soulier E, Caillard S, Stoll-Keller F, Fafi-Kremer S. 2017. 45 years after the discovery of human polyomaviruses BK and JC: time to speed up the understanding of associated diseases and treatment approaches. *Crit Rev Microbiol* 43:178–195. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1189873>.
- Schaub S, Hirsch HH, Dickenmann M, Steiger J, Mihatsch MJ, Hopfer H, Mayr M. 2010. Reducing immunosuppression preserves allograft function in presumptive and definitive polyomavirus-associated nephropathy. *Am J Transplant* 10:2615–2623. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03310.x>.
- Menter T, Mayr M, Schaub S, Mihatsch MJ, Hirsch HH, Hopfer H. 2013. Pathology of resolving polyomavirus-associated nephropathy. *Am J Transplant* 13:1474–1483. <https://doi.org/10.1111/ajt.12218>.
- Mayr M, Nickelleit V, Hirsch HH, Dickenmann M, Mihatsch MJ, Steiger J. 2001. Polyomavirus BK nephropathy in a kidney transplant recipient: critical issues of diagnosis and management. *Am J Kidney Dis* 38:E13.
- 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, ESCMID Study Group of Infection in Compromised Hosts. 2014. European perspective on human polyomavirus infection, replication and disease in solid organ transplantation. *Clin Microbiol Infect* 20(Suppl 7):74–88. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12538>.
- Sener A, House AA, Jevnikar AM, Boudville N, McAlister VC, Muirhead N, Rehman F, Luke PP. 2006. Intravenous immunoglobulin as a treatment



- for BK virus associated nephropathy: one-year follow-up of renal allograft recipients. *Transplantation* 81:117–120. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000181096.14257.c2>.
15. Sharma AP, Moussa M, Casier S, Rehman F, Filler G, Grimmer J. 2009. Intravenous immunoglobulin as rescue therapy for BK virus nephropathy. *Pediatr Transplant* 13:123–129. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3046.2008.00958.x>.
  16. Anyaegbu EI, Almond PS, Milligan T, Allen WR, Gharaybeh S, Al-Akash SI. 2012. Intravenous immunoglobulin therapy in the treatment of BK viremia and nephropathy in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Transplant* 16:E19–E24. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3046.2010.01384.x>.
  17. Vu D, Shah T, Ansari J, Naraghi R, Min D. 2015. Efficacy of intravenous immunoglobulin in the treatment of persistent BK viremia and BK virus nephropathy in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 47:394–398. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2015.01.012>.
  18. Kable K, Davies CD, O'Connell PJ, Chapman JR, Nankivell BJ. 2017. Clearance of BK virus nephropathy by combination antiviral therapy with intravenous immunoglobulin. *Transplant Direct* 3:e142. <https://doi.org/10.1097/TXD.0000000000000641>.
  19. Randhawa P, Pastrana DV, Zeng G, Huang Y, Shapiro R, Sood P, Puttara-jappa C, Berger M, Hariharan S, Buck CB. 2015. Commercially available immunoglobulins contain virus neutralizing antibodies against all major genotypes of polyomavirus BK. *Am J Transplant* 15:1014–1020. <https://doi.org/10.1111/ajt.13083>.
  20. Solis M, Velay A, Porcher R, Domingo-Calap P, Soulier E, Joly M, Meddeb M, Kack-Kack W, Moulin B, Bahram S, Stoll-Keller F, Barth H, Caillard S, Fafi-Kremer S. 2018. Neutralizing antibody-mediated response and risk of BK virus-associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 29:326–334. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017050532>.
  21. Jordan SC, Tyan D, Czer L, Toyoda M. 1998. Immunomodulatory actions of intravenous actions of intravenous immunoglobulins (i.v. Ig): Potential applications in applications in solid organ transplant recipients. *Pediatr Transplant* 2:92–105.
  22. Casadei DH, del C Rial M, Opelz G, Golberg JC, Argento JA, Greco G, Guardia OE, Haas E, Raimondi EH. 2001. A randomized and prospective study comparing treatment with high-dose intravenous immunoglobulin with monoclonal antibodies for rescue of kidney grafts with steroid-resistant rejection. *Transplantation* 71:53–58. <https://doi.org/10.1097/00007890-200101150-00009>.
  23. Jordan SC, Tyan D, Stablein D, McIntosh M, Rose S, Vo A, Toyoda M, Davis C, Shapiro R, Adey D, Milliner D, Graff R, Steiner R, Ciancio G, Sahnay S, Light J. 2004. Evaluation of intravenous immunoglobulin as an agent to lower allosensitization and improve transplantation in highly-HLA sensitized adult patients with end stage renal disease: Report of the NIH IG02 trial. *J Am Soc Nephrol* 15:3256–3262. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000145878.92906.9f>.
  24. Vo AA, Lukovsky M, Toyoda M, Wang J, Reinsmoen NL, Lai CH, Peng A, Villicana R, Jordan SC. 2008. Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization during renal transplantation. *N Engl J Med* 359:242–251. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0707894>.
  25. Perez EE, Orange JS, Bonilla F, Chinen J, Chinn IK, Dorsey M, El-Gamal Y, Harville TO, Hossny E, Mazer B, Nelson R, Secord E, Jordan SC, Stiehm ER, Vo AA, Ballou M. 2017. Update on the use of immunoglobulin in human disease: a review of evidence. *J Allergy Clin Immunol* 139:S1–S46. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.023>.
  26. Pastrana DV, Ray U, Magaldi TG, Schowalter RM, Çuburu N, Buck CB. 2013. BK polyomavirus genotypes represent distinct serotypes with distinct entry tropism. *J Virol* 87:10105–10113. <https://doi.org/10.1128/JVI.01189-13>.
  27. Randhawa PS, Schonder K, Shapiro R, Farasati N, Huang Y. 2010. Polyomavirus BK neutralizing activity in human immunoglobulin preparations. *Transplantation* 89:1462–1465. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181daaaf1>.
  28. Solis M, Meddeb M, Sueur C, Domingo-Calap P, Soulier E, Chabaud A, Perrin P, Moulin B, Bahram S, Stoll-Keller F, Caillard S, Barth H, Fafi-Kremer S, French BKV Study Group. 2015. Sequence variation in amplification target genes and standards influences interlaboratory comparison of BK virus DNA load measurement. *J Clin Microbiol* 53:3842–3852. <https://doi.org/10.1128/JCM.02145-15>.
  29. Sueur C, Solis M, Meddeb M, Soulier E, Domingo-Calap P, Lepiller Q, Freitag R, Bahram S, Caillard S, Barth H, Stoll-Keller F, Fafi-Kremer S. 2014. Toward standardization of BK virus monitoring: evaluation of the BK virus R-gene kit for quantification of BK viral load in urine, whole-blood, and plasma specimens. *J Clin Microbiol* 52:4298–4304. <https://doi.org/10.1128/JCM.02031-14>.
  30. Pastrana DV, Brennan DC, Cuburu N, Storch GA, Viscidi RP, Randhawa PS, Buck CB. 2012. Neutralization serotyping of BK polyomavirus infection in kidney transplant recipients. *PLoS Pathog* 8: 1078–1084. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002650>.
  31. Gilis L, Morisset S, Billaud G, Ducastelle-Leprêtre S, Labussière-Wallet H, Nicolini FE, Barraco F, Detrait M, Thomas X, Tedone N, Sobh M, Chidiac C, Ferry T, Salles G, Michallet M, Ader F, Lyon BK Virus Study Group. 2014. High burden of BK virus-associated hemorrhagic cystitis in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 49:664–670. <https://doi.org/10.1038/bmt.2013.235>.
  32. Luo C, Bueno M, Kant J, Randhawa P. 2008. Biologic diversity of polyomavirus BK genomic sequences: implications for molecular diagnostic laboratories. *J Med Virol* 80:1850–1857. <https://doi.org/10.1002/jmv.21281>.
  33. Wijeyesundera DN, Austin PC, Hux JE, Beattie WS, Laupacis A. 2009. Bayesian statistical inference enhances the interpretation of contemporary randomized controlled trials. *J Clin Epidemiol* 62:13–21. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2008.07.006>.
  34. Spiegelhalter DJ, Myles JP, Jones DR, Abrams KR. 1999. Methods in health service research. An introduction to Bayesian methods in health technology assessment. *BMJ* 319:508–512. <https://doi.org/10.1136/bmj.319.7208.508>.
  35. Adamina M, Tomlinson G, Guller U. 2009. Bayesian statistics in oncology. a guide for the clinical investigator. *Cancer* 115:5371–5381. <https://doi.org/10.1002/cncr.24628>.

## Letter to the Editor concerning “Cytomegalovirus prevention strategies and the risk of BK polyomavirus viremia and nephropathy”

### To the Editor:

Based on a post hoc analysis, Reischig et al reported that prophylaxis with valganciclovir was a risk factor for BK virus (BKV) replication in kidney transplant (KT) recipients.<sup>1</sup> The authors speculate that ganciclovir could inhibit BKV-specific T-cell immunity.

We believe that these conclusions may be unwarranted because of several potential caveats. First, the samples were collected during a long period (2003-2012) and the frequency of collection was highly heterogeneous. Second, patients who received valganciclovir prophylaxis were more frequently treated with induction therapy and tacrolimus—two well-known risk factors for BKV replication. Conversely, the same patients have less frequently received sirolimus, which may instead act as a protective factor.<sup>2</sup> Finally, donors in this group were older and more likely to be expanded-criteria donors—two factors that further increase the risk of BKV infection.

In an effort to further clarify this issue, we analyzed the dataset of patients who underwent kidney transplantation in our

center during 2017. BKV replication was monitored with quantitative real-time PCR (BKV R-Gene kit, bioMérieux), using a threshold of 267 IU/mL of whole blood. BKV monitoring was performed twice per month until M3 and once a month until M12. In cytomegalovirus (CMV)-positive recipients, CMV monitoring was performed once a week until M3, twice per month until M6, and once a month until M12. In CMV-D-/R-, CMV monitoring was performed once a month. The incidence of BKV replication was assessed in 22 CMV-negative recipients (with CMV-positive donors) who received valganciclovir prophylaxis (duration: 200 days) vs 85 CMV-positive recipients and D-/R- cases who were managed with preemptive strategy.

There were no intergroup differences in terms of baseline characteristics (Table 1). The incidence of BKV replication at M12 did not differ according to the CMV prophylaxis strategy: prevalence of viremia in the former and latter group was 9.41% vs 9.09%, respectively,  $P = .9$ . The incidence of BKV viremia was higher in the study by Reischig et al compared with that reported herein. We believe that

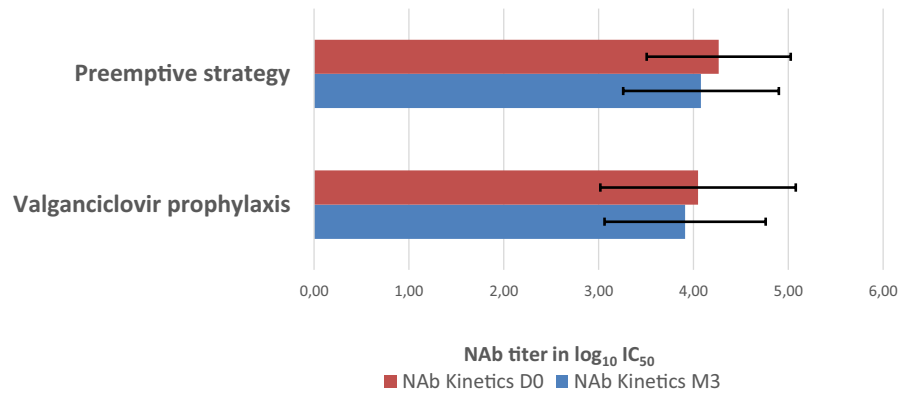
	Preemptive strategy (n = 85)	Valganciclovir prophylaxis (n = 22)	P
Male sex	53 (62)	15 (68)	.61
Age, y	53.0 (14.5)	56.6 (13.2)	.28
Deceased donor	63 (74)	19 (86)	.46
First transplantation	75 (88)	19 (86)	.73
Cold ischemia time, min	747.5 (475.5)	788.0 (391)	.81
Induction therapy			
Thymoglobulin	42 (49)	10 (45)	.74
Basiliximab	43 (51)	12 (55)	.74
Rituximab	4 (5)	1 (5)	1
Maintenance therapy			
Ciclosporine	46 (54)	10 (45)	.47
Tacrolimus	39 (46)	12 (55)	.47
MMF	82 (96)	19 (86)	.10
Everolimus	3 (4)	3 (14)	.10
Corticoids	85 (100)	22 (100)	1

Continuous variables are presented as means (standard deviations), whereas categorical data are given as counts (percentages).

MMF, mycophenolate mofetil.

**TABLE 1** Baseline characteristics of patients according to the CMV prevention strategy

**FIGURE 1** Neutralizing antibody (NAb) titer levels on the day of kidney transplantation (D0) and in the third posttransplant month in patients treated with the preemptive strategy vs patients who received valganciclovir prophylaxis. No significant intergroup differences were evident. Mean NAb titer levels are represented by bars and bar errors refer to standard deviation [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



this discrepancy may be at least in part explained by two factors. First, the duration of follow-up in the research by Reischig et al was longer compared with our report (3 vs 1 year, respectively). Second, we implemented a preventive strategy based on a close monitoring of BKV viruria and BKV-neutralizing antibody (NAb) titers.

In both group, NAb titers were investigated to cast light on the potential role of specific B-cell immunity against BKV. In our cohort, valganciclovir did not have an impact on NAb titers—which has been described as a protective factor against BKV replication.<sup>3</sup> NAb levels from the day of transplantation to M3 were similar in both groups, suggesting that valganciclovir does not interfere with BKV specific B-cell immunity (Figure 1). However, we have to acknowledge that our cohort is smaller with shorter follow-up compared with the Reischig et al cohort.


In light of our data and given the potential caveats inherent in the study by Reischig et al, we believe that no firm conclusions can be drawn on the role of valganciclovir as a risk factor for BKV replication.


## DISCLOSURE

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*.

## KEYWORDS

clinical research/practice, infection and infectious agents – viral: BK/JC/polyoma, infection and infectious agents – viral: Cytomegalovirus (CMV), infectious disease, kidney transplantation/nephrology

Ilies Benotmane<sup>1,2,3</sup>   
Morgane Solis<sup>2,3</sup>

Bruno Moulin<sup>1,3</sup>  
Samira Fafi-Kremer<sup>2,3</sup>   
Sophie Caillard<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Service de Néphrologie et Transplantation, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Virologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>3</sup>Inserm UMR S1109, LabEx Transplantex, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France

## Correspondence

Ilies Benotmane  
Email: [ilies.benotmane@chru-strasbourg.fr](mailto:ilies.benotmane@chru-strasbourg.fr)

## ORCID

Ilies Benotmane  <https://orcid.org/0000-0001-9113-2479>

Samira Fafi-Kremer  <https://orcid.org/0000-0003-3886-7833>

## REFERENCES

1. Reischig T, Kacer M, Hes O, et al. Cytomegalovirus prevention strategies and the risk of BK polyomavirus viremia and nephropathy. *Am J Transplant*. 2019;8:2578-2596.
2. Berger SP, Sommerer C, Witzke O, et al. Two-year outcomes in de novo renal transplant recipients receiving everolimus-facilitated calcineurin inhibitor reduction regimen from the TRANSFORM study. *Am J Transplant*. <https://doi.org/10.1111/ajt.15480>. [published online ahead of print 2019].
3. Solis M, Velay A, Porcher R, et al. Neutralizing antibody-mediated response and risk of BK virus-associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29:326-334.

# SARS-Cov-2 Seroprevalence in a French Kidney Transplant Center Located Within a “High-risk” Zone

Sophie Caillard, MD, PhD,<sup>1</sup> Ilies Benotmane, MD,<sup>1,2</sup> Céline Meidinger,<sup>1</sup> Vanessa Jegou,<sup>1</sup> Sandra Ludwiler,<sup>1</sup> Anne Rihon,<sup>1</sup> Audrey Desmarquets,<sup>1</sup> Lucille Steinmetz,<sup>1</sup> Murielle Morvan,<sup>1</sup> Karima Kedjam,<sup>1</sup> Amandine Bigot,<sup>1</sup> Danielle Roy,<sup>1</sup> Dominique Schmitt,<sup>1</sup> David Marx, MD,<sup>1,2</sup> Xavier Bassand, MD,<sup>1</sup> Peggy Perrin, MD,<sup>1,2</sup> Gabriela Gautier Vargas, MD,<sup>1</sup> Noelle Cognard, MD,<sup>1</sup> Jérôme Olgne, MD,<sup>1</sup> Laura Braun, MD,<sup>1</sup> Françoise Heibel, MD,<sup>1</sup> Jonas Martzloff, MD,<sup>1</sup> Bruno Moulin, MD, PhD,<sup>1</sup> and Samira Fafi Kremer, PharmD, PhD<sup>2,3</sup>

**Background.** Data on severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) seroprevalence in kidney transplant recipients (KTRs) remain rare. We sought to shed further light on this issue by conducting a single-center study in a kidney transplant center located in one of the France's highest risk zone (Grand Est) for coronavirus disease 2019 (Covid-19) during the initial disease outbreak. **Methods.** To this aim, we used a survey approach coupled with systematic investigation of SARS-CoV-2 serology in a cohort of 1390 KTRs. **Results.** SARS-CoV-2 serologies were available for 780 survey respondents, among whom 48 had anti-SARS-CoV-2 antibodies (total seroprevalence: 6.2%). Thirty-five of the 48 seropositive KTRs had previously received a diagnosis of Covid-19, whereas the remaining 13 patients were not known to be infected (8 asymptomatic cases). Specifically, 18.7% of seropositive KTRs and 1.1% of the entire cohort were asymptomatic. Household exposure was found to markedly increase the risk of SARS-CoV-2 transmission. **Conclusions.** Our findings demonstrate that the overall SARS-CoV-2 seroprevalence in KTRs living in one of the France's highest risk zone for Covid-19 during the first French lockdown was as low as 6.3%. Rapid and strict implementation of protective measures could have significantly mitigated virus spread even in an area of high virus circulation.

(*Transplantation* 2021;105: 2165–2169).

## INTRODUCTION

As of the beginning of 2020, solid organ transplant recipients have been immensely impacted by the coronavirus disease 2019 (Covid-19) pandemic.<sup>1–3</sup> In this scenario, population-based surveys of anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) antibodies can provide valuable insights into the dynamics and control of infection rates and are paramount to understand the course of the pandemic.<sup>4</sup> Unfortunately, SARS-CoV-2 testing during the initial wave of Covid-19 was limited by shortage of reagents and screening kits. This issue, coupled with the potential

occurrence of asymptomatic infections, may have lead to underestimating the real prevalence of the disease.<sup>5,6</sup>

There are efforts underway to gain further insight into the seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies to assess the potential achievement of herd immunity. However, published serologic surveys conducted between January 2020 and July 2020 have shown a consistently low seroprevalence across continents—including Europe (Switzerland, 10.8%<sup>4</sup>; Spain, 4.6%<sup>5</sup>; United Kingdom, 8.2%<sup>6</sup>; Italy, 11%<sup>7</sup>; Belgium, 6.9%<sup>8</sup>; Germany, 0.97%<sup>9</sup>; France, 3.1%–10%<sup>10</sup>; and Iceland, 0.8%),<sup>11</sup>

Received 16 December 2020. Revision received 17 January 2021.

Accepted 9 February 2021.

<sup>1</sup> Department of Nephrology and Transplantation, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France.

<sup>2</sup> INSERM U1109, LabEx TRANSPLANTEX Strasbourg, France.

<sup>3</sup> Department of Virology, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France.

The authors declare no funding or conflicts of interest.

S.C. designed the study, performed data collection and interpretation, performed statistical analyses, and drafted the article. I.B. performed data collection and interpretation and drafted the article. C.M. designed the study and participated in data collection. V.J., S.L., A.R., A.D., L.S., M.M., K.K., A.B., D.R., and D.S. were in charge of clinical management and participated in data collection. P.P., D.M., X.B., G.G.V., N.C., J.O., L.B., F.H., J.M., and B.M. participated in clinical

management, data collection, and critical revision of the article. S.F.K. was in charge of laboratory testing and critically revised the article. All authors approved the final version of the article.

Supplemental digital content (SDC) is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text, and links to the digital files are provided in the HTML text of this article on the journal's Web site ([www.transplantjournal.com](http://www.transplantjournal.com)).

Correspondence: Sophie Caillard, Department of Nephrology and Transplantation, Strasbourg University Hospital, 1 Pl de l'hôpital, Strasbourg 67091, France. ([sophie.caillard@chru-strasbourg.fr](mailto:sophie.caillard@chru-strasbourg.fr)).

Copyright © 2021 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 0041-1337/21/10510-2165

DOI: 10.1097/TP.00000000000003766

Asia (China, 3.2%–3.8%),<sup>12</sup> and America (Canada, 0.55%<sup>13</sup>; United States, 1%–6.9%).<sup>14,15</sup> Another issue is that the rate of asymptomatic infections—which was initially calculated based on pilot reports from China and passengers on the Diamond Princess cruise ship<sup>16</sup>—is markedly higher than that initially believed (40%–45% versus 15%–18%, respectively).<sup>17</sup>

Attempts to better understand the seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in specific clinical settings are currently ongoing. Because reliable data on SARS-CoV-2 seroprevalence in immunosuppressed kidney transplant recipients (KTRs) remain scarce, we sought to shed further light on this issue by conducting a single-center study in a kidney transplant center located in one of the France's highest risk zone (Grand Est) for Covid-19 during the first French lockdown. Specifically, the purpose of this study was 2-fold, that is, to examine the seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in our KTR population and to identify the rate of asymptomatic Covid-19 infections in this sample of immunosuppressed patients. To achieve these goals, we used a survey approach coupled with systematic investigation of SARS-CoV-2 serology.

## MATERIALS AND METHODS

All KTRs included in the study—who had been transplanted at the Department of Nephrology, Strasbourg University Hospital (Grand Est, France) before March 6, 2020—that is, before the first French lockdown (mandated on March 17, 2020)—were asked to undergo SARS-CoV-2 serology either in a private laboratory facility or in our center. Only patients with a functioning graft were deemed eligible. While different ELISA (ELISA) kits were used for serology testing (see Supplementary List S1, SDC, <http://links.lww.com/TP/C199>), all of them were formally

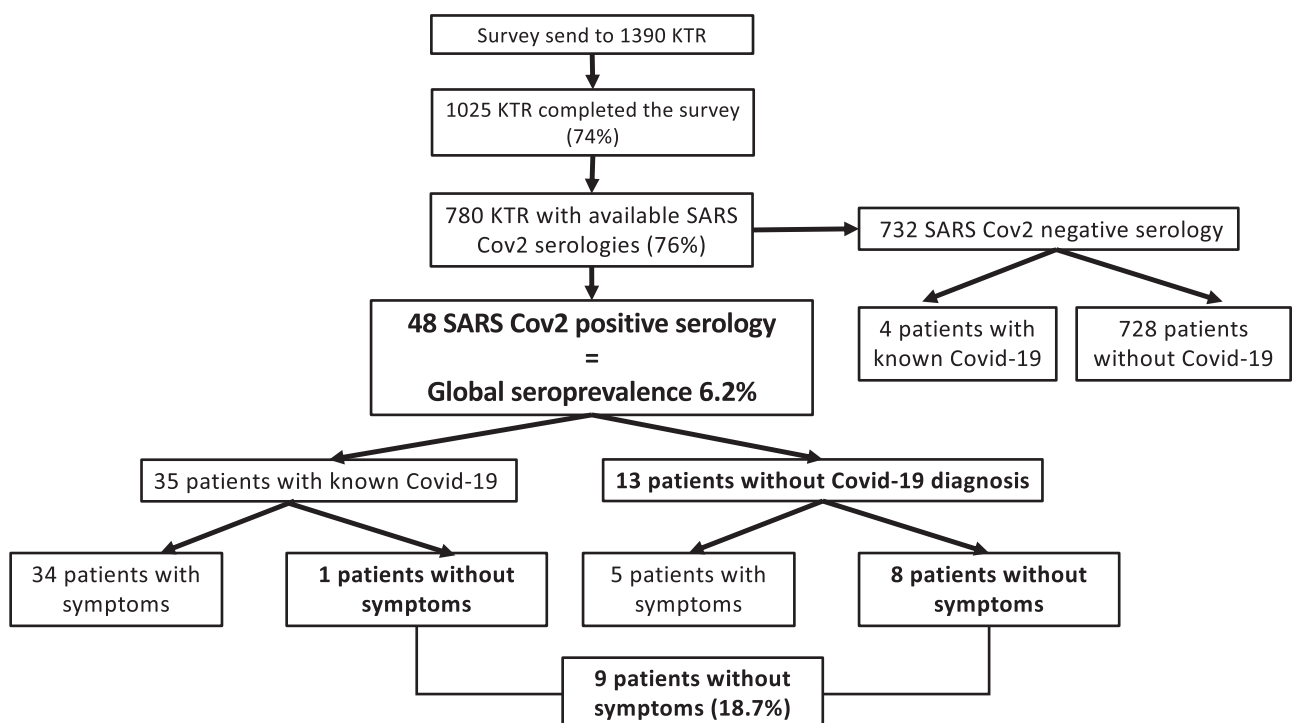
approved by French health authorities after validation of their performance.<sup>18</sup> Acquisition of data on anti-SARS-CoV-2 antibodies terminated on September 15, 2020. In parallel, the following survey (see Supplementary Survey S1, SDC, <http://links.lww.com/TP/C199>) was sent by either email or postal service on June and August 2020:

1. Did you experience infectious symptoms between January and June 2020 and, if yes, of what type?
2. Did you have contact with a Covid-19 confirmed case and, if yes, was the contact person within your household or not?
3. Did you undergo nasopharyngeal swab testing and, if yes, what were the laboratory results?

The study was approved by the local institutional review board (approval number: DC-2013-1990).

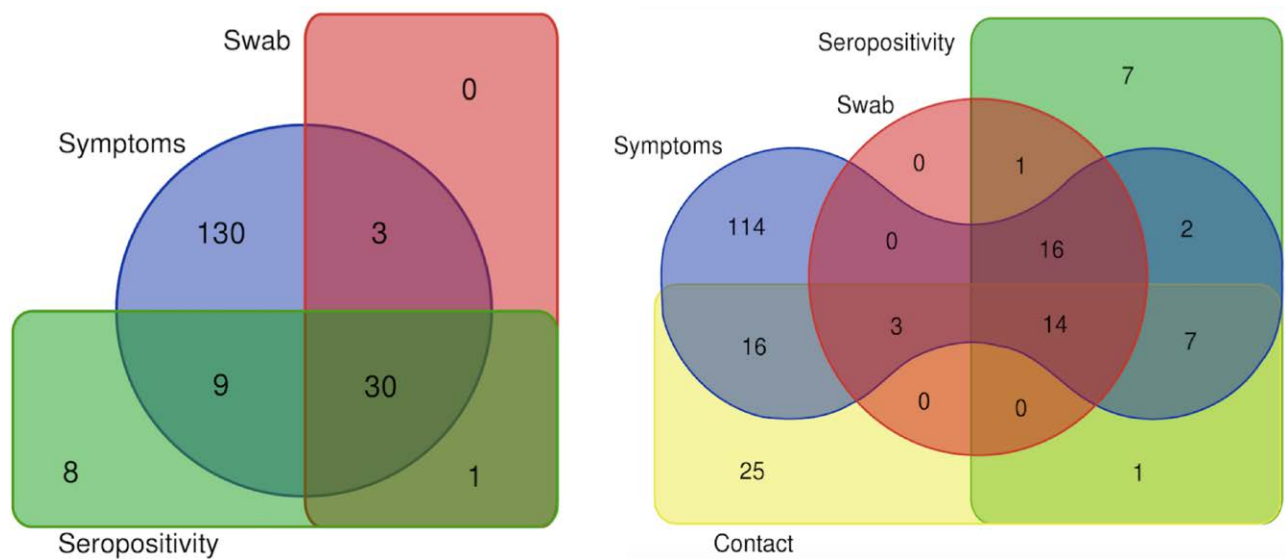
## RESULTS

Of the 1390 KTRs who received the survey, 1025 returned the questionnaire (response rate: 74%). Findings concerning infection symptoms and contact tracing are summarized in Figure S1 (SDC, <http://links.lww.com/TP/C199>). Results of SARS-CoV-2 serology were available for 780 respondents (76%; Figure 1), among whom 48 had anti-SARS-CoV-2 antibodies (total seroprevalence: 6.2%). Of the 48 seropositive KTRs, 9 did not experience infection symptoms (prevalence of asymptomatic Covid-19: 18.7%). Thirty-five of the 48 seropositive KTRs (73%) had previously received a diagnosis of Covid-19. Of them, 31 had positive reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) testing of nasopharyngeal swabs and 2 presented typical lung CT imaging findings. The remaining 2 cases had highly suggestive clinical symptoms (eg, anosmia/ageusia) or reported a household contact with a



**FIGURE 1.** Flow of kidney transplant recipients through the study. Covid-19, coronavirus disease 2019; KTR, kidney transplant recipient; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.





**FIGURE 2.** Venn diagrams summarizing the reciprocal interrelations between clinical symptoms, contact with a confirmed case of Covid-19, positive RT-PCR testing of nasopharyngeal swabs, and results of SARS-CoV-2 serology. A, Interrelations between clinical symptoms, positive RT-PCR testing of nasopharyngeal swabs, and SARS-CoV-2 serology. B, Interrelations between clinical symptoms, contact with a confirmed case of Covid-19, positive RT-PCR testing of nasopharyngeal swabs, and SARS-CoV-2 serology. Covid-19, coronavirus disease 2019; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

confirmed case. Four patients with a confirmed diagnosis of Covid-19 had negative serology testing. Among the 38 patients who were diagnosed with Covid-19, 7 were managed at home, 21 were hospitalized in a conventional unit, and 10 were directly admitted or subsequently transferred into an intensive care unit.

Thus, the seroprevalence among KTRs with known Covid-19 was 89.7% (35/39; Figure 1). We identified 13 patients (1.7% of the entire cohort) who had a positive SARS-CoV-2 serology in the absence of known disease. Of them, 5 reported infection symptoms between the end of January and April 2020. Notably, 4 of these 5 patients had a contact with a known Covid-19 case. The remaining 8 cases remained asymptomatic during the 6 mo before the termination of the survey. Of these 5 KTRs, only 1 reported a contact with a known Covid-19 case during an outpatient visit. Based on these findings, the frequency of completely asymptomatic Covid-19 in our cohort of KTRs was 1.1% (9/780).

The reciprocal interrelations between self-reported symptoms, contact tracing, positive RT-PCR testing of nasopharyngeal swabs, and positivity for anti-SARS-CoV-2 antibodies in the 780 study patients are summarized in Figure 2. The prevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies was higher in symptomatic than in asymptomatic patients (23% versus 1.5%, respectively) and in those who had a contact with a known Covid-19 case compared with those who did not (33% versus 3.6%, respectively; Table 1). As expected, the seroprevalence was higher for patients who reported a household contact (44%) than for those with a known no-household contact (eg, friends, relatives, colleagues, or other patients; 22%).

The sensitivity and specificity of different infection symptoms for diagnosing Covid-19 in our cohort of KTRs during the ongoing Covid-19 pandemic are shown in Table S1 (SDC, <http://links.lww.com/TP/C199>). While fever and diarrhea had the highest sensitivity for a diagnosis

of Covid-19, the maximum positive predictive value was observed for ageusia/anosmia.

## DISCUSSION

Our findings demonstrate that the overall SARS-CoV-2 seroprevalence in KTRs living in one of the France's highest risk zone for Covid-19 during the first French lockdown was as low as 6.3%. While this study specifically focused on an immunocompromised population, it also served to compare the frequency of anti-SARS-CoV-2 antibodies with that reported for French immunocompetent subjects. In this regard, the following adjusted seroprevalence estimates

**TABLE 1.**

**Results of SARS-CoV-2 serology according to presence or absence of symptoms, history of contact with a confirmed case, and results of RT-PCR testing of nasopharyngeal swabs**

	Positive serology (n = 48)	Negative serology (n = 732)
Symptoms (n = 780)		
Yes	39 (23%)	133 (77%)
No <sup>a</sup>	9 (1.5%)	599 (98.5%)
Contact with a confirmed case <sup>b</sup> (n = 779)		
Yes	22 (33%)	44 (67%)
No	26 (3.6%)	687 (96.4%)
RT-PCR testing (n = 152)		
Positive	31 (91%)	3 (9%)
Negative <sup>c</sup>	7 (5.9%)	111 (94.1%)

Data are summarized as counts (percentages).

<sup>a</sup>Including 1 case of known Covid-19 diagnosed by nasopharyngeal swab.

<sup>b</sup>Unknown data, n = 1.

<sup>c</sup>Including 5 cases diagnosed with Covid-19 based on CT findings or typical clinical symptoms coupled with contact with a confirmed case.

Covid-19, coronavirus disease 2019; CT, computed tomography; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

have been recently published: 10.0% for Ile de France, 9.0% for Grand Est (the same region in which our study was conducted), and 3.1% for Nouvelle Aquitaine<sup>10</sup>—with the first 2 areas being zones of high SARS-CoV-2 circulation. These results suggest that SARS-CoV-2 seroprevalence may be lower for KTRs compared with the general French population. It is not possible, however, to conclude whether the frequency of anti-SARS-CoV-2 antibodies in immunocompromised hosts is invariably lower than that of immunocompetent subjects because the reported seroprevalence for the general population vary widely between 0.9% (in a nationwide study from Iceland)<sup>11</sup> and 11% (in some high-risk areas in Italy).<sup>7</sup>

Further clarification of SARS-CoV-2 seroprevalence in specific clinical populations can also assist in our understanding of antibody response against the virus. For example, a recent United States nationwide study reported a mean seroprevalence of 8% in patients undergoing dialysis—albeit with marked geographic differences (from 1.9% in Missouri to 33.6% in New York City).<sup>19</sup> Dialysis patients are at increased risk for Covid-19 because they need to visit a healthcare facility 3 times per wk. Other studies conducted in New York City and London reported a global seroprevalence of respectively 16.6% and 10.3% in KTRs—which is significantly higher than that observed in the present investigation.<sup>20,21</sup> This can be explained by the lower frequency of symptomatic cases of Covid-19 in our cohort (versus 132 cases out of 1475 KTRs reported in the US study)<sup>20</sup> and the lower population density in France.

On analyzing the occurrence of asymptomatic Covid-19 in our sample, we found that KTRs comprised less asymptomatic cases than those observed in the general population. Specifically, 18.7% of seropositive KTRs and 1.1% of the entire cohort were asymptomatic. A recent review of 16 studies involving patients with positive RT-PCR testing of nasopharyngeal swabs reported a 40%–45% rate of asymptomatic SARS-CoV-2 infection (range, 30.8%–87.9%).<sup>17</sup> A multicohort analysis conducted by Carrat et al<sup>7</sup> showed that anti-SARS-CoV-2 antibodies are present in 3.7% of French asymptomatic patients. The results reported by Azzi et al<sup>20</sup> in a transplant population from New York City revealed that asymptomatic patients had a seroprevalence of 6.5%. Prompt implementation of protective measures (eg, social distancing and use of facial masks) in our KTRs could have significantly mitigated virus spread (even in a high-risk zone) and likely had an effect on the observed seroprevalence rate.

In our study, the presence of anti-SARS-CoV-2 antibodies appeared to be associated with a clinical diagnosis of Covid-19, a contact with a known Covid-19 case (especially within the household), and the presence of infection symptoms like fever and ageusia/anosmia. Household exposure is known to markedly increase the risk of SARS-CoV-2 transmission. In a study conducted in Iceland, Gudbjartsson et al<sup>11</sup> observed that subjects with household exposure had a 5.2-fold increased likelihood of being seropositive than those with other exposure types. We found that, of our KTRs who reported a household contact with a known Covid-19 case, 34% had anti-SARS-CoV-2 antibodies. Because a similar frequency was described in the Spanish serosurvey (37.4%),<sup>2</sup> we believe that active prevention and control measures to limit virus spread should be vigorously implemented for the KTR population.

There are several limitations to this study. First, serological testing was not conducted in a centralized laboratory; however, all of the ELISA kits used for serology were formally approved by French health authorities and displayed good performances.<sup>18</sup> Second, anti-SARS-CoV-2 antibodies were searched after a median of 3 mo from symptom onset, and a limited number of KTRs were tested between 6 and 8 mo. On analyzing the dynamics of serological response in healthcare personnel, Patel et al<sup>22</sup> found that 58% of subjects had antibodies below the detection threshold at 60 d from appearance of symptoms. Thus, the cross-sectional nature of our study could be associated with a bias related to the transient nature of antibodies. Even so, 72.4% of our KTRs were found to display anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin G up to 6 mo after symptomatic Covid-19.<sup>23</sup> Third, sole reliance on serology for estimating the rates of SARS-CoV-2 infection in our population has inherent caveats. Indeed, it has been demonstrated that some patients, particularly those with a household contact with a known Covid-19 case, could develop T-cell immunity without simultaneous humoral protection.<sup>24</sup> It is also possible that patients with previous exposure to seasonal coronaviruses could have developed cross-reactive T-cell immunity against SARS-CoV-2, which can make them more likely to have pauci- or asymptomatic infections without an accompanying humoral response.<sup>25,26</sup> Fourth, it would have been interesting to measure neutralizing antibodies, which are probably the most effective in conferring protective immunity against the virus. Thus, implementation of Covid T cell and neutralizing antibodies detection tests could help clarify the global response of our patients against SARS-CoV-2. Unfortunately, these high-end assays are expensive and time consuming, ultimately being unsuitable for routine use in a large number of patients. Finally, a key prerequisite for inclusion in the study was the ability to respond to the survey; thus, patients who died of Covid-19 were not represented in our report. In general, the mortality rate from the disease in our KTRs approached 20%.

Despite these limitations, our findings indicate that KTRs with Covid-19 are capable of developing an effective humoral response against SARS-CoV-2. Although the study was conducted in one of the France's highest risk zone for Covid-19 during the first French lockdown, the overall seroprevalence was as low as 6.3%. Moreover, we found that asymptomatic cases of Covid-19 among KTRs were uncommon (1.1% of the entire cohort and 18.7% of seropositive KTRs). Further research is needed to examine more rigorously the hypothesis of protection conferred by anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibodies, as well as to clarify the potential occurrence of specific cellular immunity.

## REFERENCES

1. Azzi Y, Bartash R, Scalea J, et al. COVID-19 and solid organ transplantation: a review article. *Transplantation*. 2021;105:37–55.
2. Zaidan M, Legendre C. Solid organ transplantation in the era of COVID-19: lessons from France. *Transplantation*. 2021;105:61–66.
3. Cholankeril G, Podboy A, Alshuwaykh OS, et al. Early impact of COVID-19 on solid organ transplantation in the United States. *Transplantation*. 2020;104:2221–2224.
4. Stringhini S, Wisniak A, Piumatti G, et al. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies in Geneva, Switzerland (SEROCoV-POP): a population-based study. *Lancet*. 2020;396:313–319.

5. Pollán M, Pérez-Gómez B, Pastor-Barriuso R, et al; ENE-COVID Study Group. Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. *Lancet*. 2020;396:535–544.
6. UK Biobank SARS-CoV-2 Serology Study. *Weekly Report—21 July 2020*. Available at [https://www.ukbiobank.ac.uk/media/s3af0k5q/ukb\\_serologystudy\\_month1\\_report.pdf](https://www.ukbiobank.ac.uk/media/s3af0k5q/ukb_serologystudy_month1_report.pdf). Accessed August 28, 2020.
7. Vena A, Berruti M, Adessi A, et al. Prevalence of antibodies to SARS-CoV-2 in Italian adults and associated risk factors. *J Clin Med*. 2020;9:E2780.
8. Herzog S, De Bie J, Abrams S, et al. Seroprevalence of IgG antibodies against SARS coronavirus 2 in Belgium: a prospective cross-sectional nationwide study of residual samples. *MedRxiv*. Preprint posted online October 1, 2020. doi:10.1101/2020.06.08.20125179
9. Aziz NH, Corman VM, Echterhoff AKC, et al. Seroprevalence and correlates of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies: results from a population-based study in Bonn, Germany. *MedRxiv*. Preprint posted online August 29, 2020. doi:10.1101/2020.08.24.20181206
10. Carrat F, Lamballerie X, Rahib D, et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2 among adults in three regions of France following the lockdown and associated risk factors: a multicohort study. *MedRxiv*. Preprint posted online September 18, 2020. doi:10.1101/2020.09.16.20195693
11. Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P, et al. Humoral immune response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med*. 2020;383:1724–1734.
12. Xu X, Sun J, Nie S, et al. Seroprevalence of immunoglobulin M and G antibodies against SARS-CoV-2 in China. *Nat Med*. 2020;26:1193–1195.
13. Skowronski DM, Sekirov I, Sabaiduc S, et al. Low SARS-CoV-2 seroprevalence based on anonymized residual sero-survey before and after first wave measures in British Columbia, Canada, March-May 2020. *MedRxiv*. Preprint posted online July 15, 2020. doi:2020.07.13.20153148
14. Havers FP, Reed C, Lim T, et al. Seroprevalence of antibodies to SARS-CoV-2 in 10 sites in the United States, March 23-May 12, 2020. *JAMA Intern Med*. [Epub ahead of print. July 21, 2020]. doi:10.1001/jamainternmed.2020.4130
15. Sood N, Simon P, Ebner P, et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2-specific antibodies among adults in Los Angeles County, California, on April 10-11, 2020. *JAMA*. 2020;323:2425–2427.
16. Mizumoto K, Kagaya K, Zarebsky A, et al. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (Covid-19) cases on board of the Diamond Princess Cruise ship, Yokohama, Japan 2020. *Euro Surveill*. 2020;25:2000180.
17. Oran DP, Topol EJ. Prevalence of asymptomatic SARS-CoV-2 infection: a narrative review. *Ann Intern Med*. 2020;173:362–367.
18. Ministère des Solidarités et de la Santé. *Guider votre choix parmi les 341 tests Covid-19 du marché*. Available at <https://covid-19.sante.gouv.fr/tests>. Accessed November 2, 2020.
19. Anand S, Montez-Rath M, Han J, et al. Prevalence of SARS-CoV-2 antibodies in a large nationwide sample of patients on dialysis in the USA: a cross-sectional study. *Lancet*. 2020;25:1335–1344.
20. Azzi Y, Parides M, Alani O, et al. COVID-19 infection in kidney transplant recipients at the epicenter of pandemics. *Kidney Int*. 2020;98:1559–1567.
21. Willicombe M, Gleeson S, Clarke C, et al; on behalf of the ICHNT Renal COVID Group. Identification of patient characteristics associated with SARS-CoV-2 infection and outcome in kidney transplant patients using serological screening. *Transplantation*. 2021;105:151–157.
22. Patel MM, Thornburg NJ, Stubblefield WB, et al. Change in antibodies to SARS-CoV-2 over 60 days among health care personnel in Nashville, Tennessee. *JAMA*. 2020;324:1781–1782.
23. Benotmane I, Gautier Vargas G, Velay A, et al. Persistence of SARS-CoV-2 antibodies in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2020;21:2307–2310.
24. Gallais F, Velay A, Nazon C, et al. Intrafamilial exposure to SARS-CoV-2 associated with cellular immune response without seroconversion, France. *Emerg Infect Dis*. 2021;27:113–21.
25. Mateus J, Grifoni A, Tarke A, et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science*. 2020;370:89–94.
26. Braun J, Loyal L, Frentsch M, et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature*. 2020;587:270–274.



# Letters

## RESEARCH LETTER

### Antibody Response After a Third Dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine in Kidney Transplant Recipients With Minimal Serologic Response to 2 Doses

Studies have reported low seroconversion rates (58% after the second dose) in solid organ transplant recipients who received a messenger RNA (mRNA) SARS-CoV-2 vaccine.<sup>1,2</sup> Based on this evidence, the French National Authority for Health issued a recommendation in April 2021 to administer a third vaccine dose in immunosuppressed patients who did not respond after 2 doses. We examined the antibody responses of kidney transplant recipients who did not respond to 2 doses and received a third dose (100 µg) of the mRNA-1273 (Moderna) vaccine.

**Methods** | All kidney transplant recipients followed up in the outpatient Kidney Transplantation Department of Strasbourg University Hospital between January 20, 2021, and June 3, 2021, with a negative history for COVID-19 and SARS-CoV-2 antispikes IgG levels less than 50 arbitrary units (AU) per milliliter on the day of the first vaccine injection and 1 month after the second dose were included. All patients received a third vaccine dose between April 9, 2021, and May 12, 2021. The study protocol was approved by the local ethics committee and written informed consent was obtained.

Anti-receptor-binding domain IgG response after the third vaccine dose was assessed using the ARCHITECT IgG II Quant test (Abbott). According to the manufacturer, titers greater than 50 AU/mL were considered positive (detection range, 6.8–80 000 AU/mL; positive agreement, 99.4%; negative agreement, 99.6%). The results of this assay have been

**Table. Association Between Patient Characteristics, Immunosuppression, and Antibody Titers After the Third Dose of a SARS-CoV-2 mRNA Vaccine in 159 Kidney Transplant Recipients**

Variables	Sample, No. (%)	Antibody titers, mean (SD)	Adjusted mean difference (95% CI) <sup>a</sup>	P value
Age, y				
≤60	93 (58.5)	720.64 (1436.17)	-94.10 (-214 to 26)	.73
>60	66 (41.5)	777.77 (1974.04)		
Sex				
Male	98 (61.6)	1009.70 (1967.29)	280.22 (-240.59 to 801.03)	.29
Female	61 (38.4)	318.06 (910.83)		
BMI <sup>b</sup>				
<25	72 (45.3)	790.28 (1532.48)	98.57 (-394.18 to 591.32)	.69
≥25	87 (54.7)	706.34 (1791.95)		
Time from transplantation, y				
>3	102 (64.2)	882.33 (1847.79)	166.69 (-346.26 to 679.64)	.52
≤3	57 (35.8)	497.45 (1288.08)		
Donor type				
Living donor	36 (22.6)	596.54 (1273.02)	7.69 (-586.47 to 601.86)	.98
Deceased donor	123 (77.4)	787.61 (1777.45)		
Immunosuppression maintenance therapy				
Tacrolimus + MMF/MPA + steroids	84 (52.8)	316.72 (797.73)	-697.28 (-1193.00 to -201.56)	.006
All other regimens	75 (47.2)	1223.31 (2198.86)		
Serum creatinine, mg/dL				
<1.47	81 (50.9)	766.84 (1305.64)	153.26 (-350.37 to 656.89)	.55
≥1.47	78 (49.1)	721.00 (1995.83)		
Antibody titers after the second vaccine dose, AU/mL				
>6.8 and <50	64 (40.3)	1426.88 (1947.30)	894.89 (377.41 to 1410.37)	.001
≤6.8	95 (59.7)	284.55 (1281.55)		

Abbreviations: AU, arbitrary units; BMI, body mass index; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; mRNA, messenger RNA.

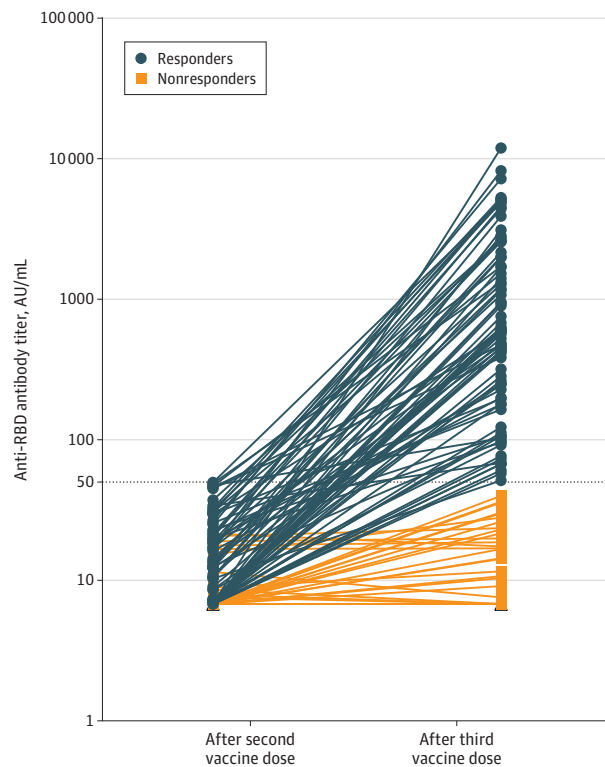
SI conversion factor: To convert creatinine values to mmol/L, multiply by 88.4.

<sup>a</sup> Model adjusted for sex, BMI, donor type, time from kidney transplantation,

serum creatinine level, triple immunosuppression (tacrolimus + MMF/MPA + steroids), and antibody titers after the second dose.

<sup>b</sup> Calculated as weight in kilograms divided by height in meters squared.

**Figure. Anti-Receptor-Binding Domain (RBD) IgG Antibody Titers Measured 28 Days After the Third Dose of mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine in 159 Kidney Transplant Recipients**



Horizontal dotted line indicates the cutoff for positivity (50 arbitrary units [AU]/mL). Blue lines indicate the antibody titers of kidney transplant recipients who seroconverted after the third dose (titers  $\geq 50$  AU/mL); orange lines, the evolution of antibody titers among nonresponders (titers  $< 50$  AU/mL). mRNA indicates messenger RNA.

shown to correlate with in vitro neutralization of SARS-CoV-2.<sup>3</sup> Mean differences adjusted for the factors in the Table were calculated using general linear models. All calculations were performed using GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad) and SPSS version 2020.0.0 (IBM).  $P < .05$  (2-sided) was considered statistically significant.

**Results** | One month after the second dose, 159 kidney transplant recipients had IgG levels less than 50 AU/mL. The median age was 57.6 years (interquartile range [IQR], 49.6-66.1 years), 61.6% were men, and the median time from transplantation was 5.3 years (IQR, 1.9-11.1 years) (Table). Ninety-five patients (59.7%) had no antibody response after 2 doses (titers  $< 6.8$  AU/mL), and 64 patients (40.3%) showed a response below the positivity limit (titers, 6.8-49.9 AU/mL). The third dose was injected a median of 51 days (IQR, 48-59 days) after the second dose. The antibody response was measured a median of 28 days (IQR, 27-33 days) after the third vaccine injection, and 78 patients (49%) had antibody levels greater than 50 AU/mL (median antibody titers of responders, 586 AU/mL; IQR, 197.2-1920.1 AU/mL) (Figure). Patients who had a weak response

after the second dose were more likely to develop an antibody response after the third dose compared with those without an antibody response (81.3% vs 27.4%, respectively; mean adjusted difference of antibody titers, 894.89 AU/mL [95% CI, 377.41-1410.37 AU/mL];  $P = .001$ ). Patients taking tacrolimus, mycophenolate, and steroids were less likely to develop anti-SARS-CoV-2 antibodies than those treated with other regimens (35% vs 63%, respectively; mean adjusted difference of antibody titers, -697.28 AU/mL [95% CI, -1193.00 to -201.56 AU/mL];  $P = .006$ ). Other variables associated with the titers of antibodies are shown in the Table. No severe adverse events were observed after the third dose.

**Discussion** | This study found that a third dose of mRNA-1273 vaccine induced a serologic response in 49% of kidney transplant recipients who did not respond after 2 doses. The findings in this large group of kidney transplant recipients are in accordance with other studies of solid organ transplant recipients.<sup>4,5</sup> However, 51% of the patients did not develop anti-SARS-CoV-2 antibodies after the third dose, especially those receiving triple immunosuppression. The possibility that patients developed cellular immunity capable of conferring protection against severe disease was not assessed. However, the occurrence of severe COVID-19 in some vaccinated transplant recipients may suggest a lack of immunity.<sup>6</sup>

Limitations of this study include that detailed B-cell and T-cell studies were not performed and that the antibody level that correlates with protection is unknown.

In conclusion, the use of a third dose of vaccine may be considered in organ transplant recipients.

Ilies Benotmane, MD  
 Gabriela Gautier, MD  
 Peggy Perrin, MD  
 Jérôme Olgne, MD  
 Noëlle Cognard, MD  
 Samira Fafi-Kremer, PharmD, PhD  
 Sophie Caillard, MD, PhD

**Author Affiliations:** Department of Nephrology and Transplantation, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France (Benotmane, Gautier, Perrin, Olgne, Cognard, Caillard); Department of Virology, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France (Fafi-Kremer).

**Corresponding Author:** Sophie Caillard, MD, PhD, Department of Nephrology and Transplantation, Strasbourg University Hospital, 1 Place de l'hôpital, 67091 Strasbourg, France (sophie.caillard@chru-strasbourg.fr).

**Accepted for Publication:** July 9, 2021.

**Published Online:** July 23, 2021. doi:10.1001/jama.2021.12339

**Author Contributions:** Drs Benotmane and Caillard had full access to all of the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

**Concept and design:** Benotmane, Caillard.

**Acquisition, analysis, or interpretation of data:** All authors.

**Drafting of the manuscript:** Benotmane, Caillard.

**Critical revision of the manuscript for important intellectual content:** All authors.

**Statistical analysis:** Benotmane, Caillard.

**Administrative, technical, or material support:** Gautier Vargas, Olgne, Cognard, Fafi-Kremer, Caillard.

**Supervision:** Caillard.

**Conflict of Interest Disclosures:** Dr Caillard reported receiving travel grants from Astellas, Novartis, and Sanofi and receiving lecture honoraria from Bristol Myers Squibb. Dr Benotmane reported receiving travel grants from Novartis, Sandoz, Fresenius Medical Care, and Chiesi. No other disclosures were reported.

**Additional Contributions:** We thank all of the physicians (Jonas Martzloff, MD, Laura Braun Parvez, MD, Françoise Heibel, MD, Bruno Moulin, MD, PhD), the clinical research team (Danielle Roy, Annie Menguy, Hugo Servais), nurses (Sandra Ludwiller, Muriel Morvan, Karima Kedjam, Lucile Steinmetz, Christelle Appenzeller), and the secretaries (Amandine Bigot and Agathe Pillon) who work in the Department of Nephrology and Transplantation, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France, and who were involved in the vaccination program and patient follow-up. We are grateful to Marie Josée Wendling and Aurélie Velay (Department of Virology, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France) for their technical support and to Marc Hazzan (Department of Nephrology and Transplantation, Lille University Hospital, Lille, France) for statistical assistance. None of these individuals received compensation for their roles in the study.

1. Boyarsky BJ, Werbel WA, Avery RK, et al. Immunogenicity of a single dose of SARS-CoV-2 messenger RNA vaccine in solid organ transplant recipients. *JAMA*. 2021;325(17):1784-1786. doi:10.1001/jama.2021.4385
2. Boyarsky BJ, Werbel WA, Avery RK, et al. Antibody response to 2-dose SARS-CoV-2 mRNA vaccine series in solid organ transplant recipients. *JAMA*. 2021;325(21):2204-2206. doi:10.1001/jama.2021.7489
3. Prendecki M, Clarke C, Brown J, et al. Effect of previous SARS-CoV-2 infection on humoral and T-cell responses to single-dose BNT162b2 vaccine. *Lancet*. 2021;397(10280):1178-1181. doi:10.1016/S0140-6736(21)00502-X
4. Werbel WA, Boyarsky BJ, Ou MT, et al. Safety and immunogenicity of a third dose of SARS-CoV-2 vaccine in solid organ transplant recipients: a case series. *Ann Intern Med*. Published online June 15, 2021. doi:10.7326/L21-0282
5. Kamar N, Abravanel F, Marion O, Couat C, Izopet J, Del Bello A. Three doses of an mRNA Covid-19 vaccine in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med*. Published online June 23, 2021. doi:10.1056/NEJMc2108861
6. Caillard S, Chavarot N, Bertrand D, et al; French Society of Transplantation. Occurrence of severe COVID-19 in vaccinated transplant patients. *Kidney Int*. Published online May 23, 2021. doi:10.1016/j.kint.2021.05.011

## Change in Saliva RT-PCR Sensitivity Over the Course of SARS-CoV-2 Infection

While real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) on nasopharyngeal swabs is the current standard for SARS-CoV-2 detection, saliva is an attractive alternative for diagnosis and screening due to ease of collection and minimal supply requirements.<sup>1,2</sup> Studies on the sensitivity of saliva-based SARS-CoV-2 molecular testing have shown considerable variability.<sup>3</sup> We conducted a prospective, longitudinal study to investigate the testing time frame that optimizes saliva sensitivity for SARS-CoV-2 detection.

**Methods |** Between June 17, 2020, and February 15, 2021, a convenience sample of individuals exposed to a household member with RT-PCR-confirmed SARS-CoV-2 within 2 weeks were recruited from Children's Hospital Los Angeles and nearby community testing sites into the Household Exposure and Respiratory Virus Transmission and Immunity Study (HEARTS). Paired nasopharyngeal and saliva samples were collected every 3 to 7 days for up to 4 weeks or until 2 negative nasopharyngeal test results. RT-PCR for SARS-CoV-2 N1 and N2 genes was performed; cycle threshold less than 40 defined a positive result. A nasopharyngeal N1 cycle threshold of 34 or less was defined as high viral

load.<sup>4</sup> Detailed specimen collection and RT-PCR methods are reported in the eMethods in the Supplement.

Saliva sensitivity was calculated using nasopharyngeal-positive RT-PCR as the reference standard. COVID-19 onset was defined as the earlier date between first symptom (collected by questionnaire daily) or first RT-PCR positivity. Pre- and postsymptomatic were defined as asymptomatic time points before and after a symptomatic interval, respectively. Saliva sensitivity by week of collection and between symptomatic and asymptomatic individuals were compared using the  $\chi^2$  test or the Fisher exact test. Generalized estimating equations were used to determine clinical characteristics (Table) associated with saliva sensitivity in nasopharyngeal-positive pairs while accounting for repeated samples from the same individuals. Analyses were performed using SPSS version 27.0 (IBM Corp) with a 2-sided  $P < .05$  considered significant. Written informed consent was obtained from participants. The study was approved by the institutional review board of Children's Hospital Los Angeles.

**Results |** We tested 889 paired nasopharyngeal swab-saliva samples from 404 participants, of which SARS-CoV-2 was detected in 524 nasopharyngeal (58.9%) and 318 saliva (35.7%) specimens. SARS-CoV-2 was detected in both specimens in 258 pairs (29.0%). Of the 256 nasopharyngeal SARS-CoV-2-positive participants (63.4%), the mean age was 28.2 years (range, 3.0-84.5 years); 108 (42.2%) were male. Participants returned for a median of 3 visits (interquartile range, 2-4). Ninety-three participants (36.3%) were asymptomatic throughout their infection; 126 (77.3%) of 163 symptomatic individuals reported mild severity.

Saliva sensitivity was highest in samples collected during the first week of infection at 71.2% (95% CI, 62.6%-78.8%) but decreased each subsequent week (Figure, A). Participants who presented with COVID-19-associated symptoms on the specimen collection day during week 1 of infection had significantly higher saliva sensitivity compared with asymptomatic participants (88.2% [95% CI, 77.6%-95.1%] vs 58.2% [95% CI, 46.3%-69.5%];  $P < .001$ ). Saliva sensitivity remained significantly higher in symptomatic participants in week 2 (83.0% [95% CI, 70.6%-91.8%] vs 52.6% [95% CI, 42.6%-62.5%];  $P < .001$ ). No difference was observed more than 2 weeks after COVID-19 onset (Figure, B). Sensitivities did not significantly differ for never-symptomatic (34.7% [95% CI, 27.3%-42.7%]), presymptomatic (57.1% [95% CI, 31.7%-80.2%]), and post-symptomatic (42.9% [95% CI, 36.8%-49.1%]) time points ( $P = .26$ ).

For each day after COVID-19 onset, the odds ratio for saliva detection was 0.94 (95% CI, 0.91-0.96) compared with the previous day ( $P < .001$ ) (Table). Participants presenting with COVID-19-associated symptoms at the time of specimen collection or with high nasopharyngeal viral loads had 2.8 (95% CI, 1.6-5.1;  $P < .001$ ) and 5.2 (95% CI, 2.9-9.3;  $P < .001$ ) higher odds of having a saliva-positive RT-PCR result compared with those with asymptomatic presentation or low nasopharyngeal viral loads, respectively.

## CORONAVIRUS

# Infection or a third dose of mRNA vaccine elicits neutralizing antibody responses against SARS-CoV-2 in kidney transplant recipients

Xavier Charmetant<sup>1†</sup>, Maxime Espi<sup>1†</sup>, Ilies Benotmane<sup>2,3,4†</sup>, Véronique Barateau<sup>1</sup>, Françoise Heibel<sup>2</sup>, Fanny Buron<sup>5</sup>, Gabriela Gautier-Vargas<sup>2</sup>, Marion Delafosse<sup>5</sup>, Peggy Perrin<sup>2</sup>, Alice Koenig<sup>1,5,6</sup>, Noëlle Cognard<sup>2</sup>, Charlene Levi<sup>5</sup>, Floriane Gallais<sup>3,4</sup>, Louis Manière<sup>5</sup>, Paola Rossolillo<sup>7</sup>, Eric Soulier<sup>4</sup>, Florian Pierre<sup>4</sup>, Anne Ovize<sup>8</sup>, Emmanuel Morelon<sup>1,5,6</sup>, Thierry Defrance<sup>1</sup>, Samira Fafi-Kremer<sup>3,4</sup>, Sophie Caillard<sup>2,3,4‡</sup>, Olivier Thauinat<sup>1,5,6\*‡</sup>

Copyright © 2022 The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works. Distributed under a Creative Commons Attribution License 4.0 (CC BY).

Transplant recipients, who receive therapeutic immunosuppression to prevent graft rejection, are characterized by high coronavirus disease 2019 (COVID-19)-related mortality and defective response to vaccines. We observed that previous infection with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), but not the standard two-dose regimen of vaccination, provided protection against symptomatic COVID-19 in kidney transplant recipients. We therefore compared the cellular and humoral immune responses of these two groups of patients. Neutralizing anti-receptor-binding domain (RBD) immunoglobulin G (IgG) antibodies were identified as the primary correlate of protection for transplant recipients. Analysis of virus-specific B and T cell responses suggested that the generation of neutralizing anti-RBD IgG may have depended on cognate T-B cell interactions that took place in germinal center, potentially acting as a limiting checkpoint. High-dose mycophenolate mofetil, an immunosuppressive drug, was associated with fewer antigen-specific B and T follicular helper (T<sub>FH</sub>) cells after vaccination; this was not observed in patients recently infected with SARS-CoV-2. Last, we observed that, in two independent prospective cohorts, administration of a third dose of SARS-CoV-2 mRNA vaccine restored neutralizing titers of anti-RBD IgG in about 40% of individuals who had not previously responded to two doses of vaccine. Together, these findings suggest that a third dose of SARS-CoV-2 mRNA vaccine improves the RBD-specific responses of transplant patients treated with immunosuppressive drugs.

## INTRODUCTION

In December 2019, an outbreak of apparently viral pneumonia of unknown etiology emerged in the city of Wuhan in the Chinese province of Hubei (1). On 9 January 2020, the World Health Organization (WHO) announced the discovery of a novel coronavirus officially named severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which is the pathogen responsible for coronavirus disease 2019 (COVID-19). The disease quickly disseminated from Wuhan, and as of 13 January 2022, more than 307 million cases have been confirmed in 218 countries (2), leading the WHO to consider COVID-19 as the first pandemic triggered by a coronavirus.

Among the various alarms raised by the pandemic was its impact on the population of patients receiving organ transplants, whose COVID-19-related mortality was estimated at about 20%, several

magnitudes higher than that of the general population (3–7). This vulnerable population of patients was therefore prioritized for vaccination against SARS-CoV-2 by health authorities (8). However, prevention of allograft rejection requires lifelong immunosuppression regimens, which nonspecifically inhibit T and B cells in transplant recipients, resulting in reduced response rates to vaccines in general (9, 10). As expected, several recent publications have documented that immunosuppressed transplant recipients develop mitigated immune responses following the standard two-dose regimen of vaccination with either of the two approved SARS-CoV-2 mRNA vaccines (11–15).

Although insufficiency of vaccinal protection in transplant recipients has emerged as a concern due to accumulating reports of severe COVID-19 in vaccinated patients (16, 17), the underlying immune mechanisms explaining this problem are still elusive (15, 18). In an attempt to determine the relative contribution of humoral and T cell immunity in conferring protection against COVID-19 and understand immunosuppression-induced defects after SARS-CoV-2 vaccination, we undertook a prospective translational study that compared recently infected and vaccinated transplant recipients.

## RESULTS

### Infection conferred increased protection against symptomatic COVID-19 to transplant recipients relative to vaccination

The incidence of COVID-19 was monitored in all 873 renal transplant recipients of Strasbourg University Hospital and compared

<sup>1</sup>CIRI, INSERM U1111, Université Claude Bernard Lyon I, CNRS UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Univ. Lyon, 21 avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, France. <sup>2</sup>Department of Nephrology and Transplantation, Strasbourg University Hospital, 67000 Strasbourg, France. <sup>3</sup>Department of Virology, Strasbourg University Hospital, 67000 Strasbourg, France. <sup>4</sup>Inserm UMR S1109, LabEx Transplantex, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France. <sup>5</sup>Department of Transplantation, Nephrology, and Clinical Immunology, Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, 5, place d'Arsonval, 69003 Lyon, France. <sup>6</sup>Claude Bernard University (Lyon 1), 43 boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne, France. <sup>7</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 7104, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1258, Université de Strasbourg, 67400 Illkirch, France. <sup>8</sup>Eurofins Biomnis Laboratory, 69007 Lyon, France. \*Corresponding author. Email: olivier.thauinat@chu-lyon.fr †These authors contributed equally to this work. ‡These authors contributed equally to this work.



between those with previous history of infection with SARS-CoV-2 (group “infected,”  $n = 137$ ) and those who received the standard two-dose regimen of vaccination with mRNA-1273 (group “vaccinated,”  $n = 736$ ). The clinical characteristics of this large epidemiological cohort are provided in table S1. Strikingly, whereas none of the recently infected patients developed symptomatic reinfection, 20 vaccinated patients developed COVID-19 (Fig. 1; log-rank test,  $P = 0.0286$ ). Of note, this observation was made during the follow-up period of recently infected patients, which was significantly longer than that of vaccinated patients [289 days, interquartile range (IQR) [119; 333] versus 79 days, IQR [56; 210];  $P < 0.0001$ , Mann-Whitney test].

The total absence of symptomatic reinfection in renal transplant recipients with previous history of COVID-19 is unexpected and conflicts with the results of previously published studies in the general population (19–22). However, in contrast with the previously published studies, of which two were conducted in health care workers (highly exposed to SARS-CoV-2) using systematic PCR (polymerase chain reaction) screening to define reinfection, our approach only allowed to capture symptomatic reinfections in a population particularly prone to strictly comply to social distancing rules (23). We concluded that SARS-CoV-2 infection confers protection against symptomatic COVID-19 to immunocompromised transplant recipients.

### Mechanistic study population details

Comparison of cellular and humoral immune responses developed by recently infected and vaccinated transplant patients offers a unique opportunity to determine which immune effector(s) is associated with protection against COVID-19 in this vulnerable population (3–7). The COVATRHUS cohort (Covid-19 Vaccine in Transplant Recipients, Hopitaux Universitaires de Strasbourg) was therefore established to prospectively collect synchronous serum and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) samples from renal transplant recipients diagnosed with COVID-19 in the absence of previous

vaccine injection (group infected,  $n = 21$ ; mean sampling time:  $30.6 \pm 6.9$  days after the onset of symptoms) or vaccinated with two doses of mRNA-1273 (group vaccinated,  $n = 29$ ; mean sampling time:  $14.7 \pm 3.7$  days after the second dose, or  $42.8 \pm 3.8$  days after initial contact with the antigen). This time point for analysis was chosen on the basis of previous studies, which reported that, in recently infected renal transplant patients, both the cellular and humoral responses against SARS-CoV-2 were clearly detectable between 25 and 37 days, although cell functionality (especially cytokine secretion) could still evolve thereafter (24).

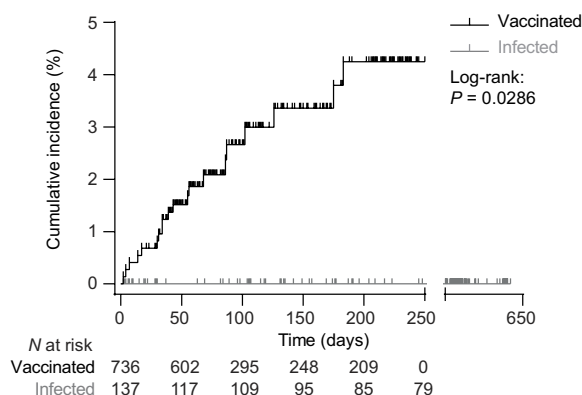
The clinical characteristics of the COVATRHUS cohort are presented in table S1. With the exception of a shorter time after transplantation in infected patients and a slightly different comorbidity profile of vaccinated patients, the rest of the clinical characteristics of COVATRHUS patients are similar to that of the epidemiological cohort. Recently infected and vaccinated patients from the COVATRHUS cohort had similar clinical profiles (table S1). Of note, the severity of COVID-19 in infected patients was mainly mild/moderate (16 of 21, 76%), and most of them did not require hospitalization (14 of 21, 67%).

### SARS-CoV-2-specific cellular immunity is comparable in previously infected and vaccinated transplant recipients

Virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells reduce disease severity and promote recovery in many respiratory infections, including those driven by coronaviruses (25, 26), by eliminating infected cells. Optimal generation of these cytotoxic effectors depends upon the help provided by the T helper 1 (T<sub>H</sub>1) CD4<sup>+</sup> T cells (27). We observed that no difference in the total count of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was observed between vaccinated and recently infected patients (Fig. 2, A and B). Cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells directed against the spike protein of SARS-CoV-2, identified by the coexpression of CD69 and CD137 (28), could be detected in the circulation of both vaccinated and recently infected patients (Fig. 2C). However, only recently infected patients had CD8<sup>+</sup> T cells directed against the other proteins of the virus (nucleocapsid and membrane). This finding was expected because nucleocapsid and membrane proteins are not included in the vaccine formulation (Fig. 2, C and D). There was no difference in spike protein-specific CD8<sup>+</sup> T cells in the circulation of patients with recent infection versus vaccinated patients (Fig. 2D). The result remained the same when all specificities (spike, nucleocapsid, and membrane) were added together to better take into account the difference of repertoire between the two groups (Fig. 2E). The functionality of these SARS-CoV-2-specific CD8<sup>+</sup> T cells was demonstrated by their ability to produce interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) upon in vitro stimulation (Fig. 2F). The frequency of IFN- $\gamma$ -producing SARS-CoV-2-specific CD8<sup>+</sup> T cells was similar between vaccinated and recently infected patients (Fig. 2G).

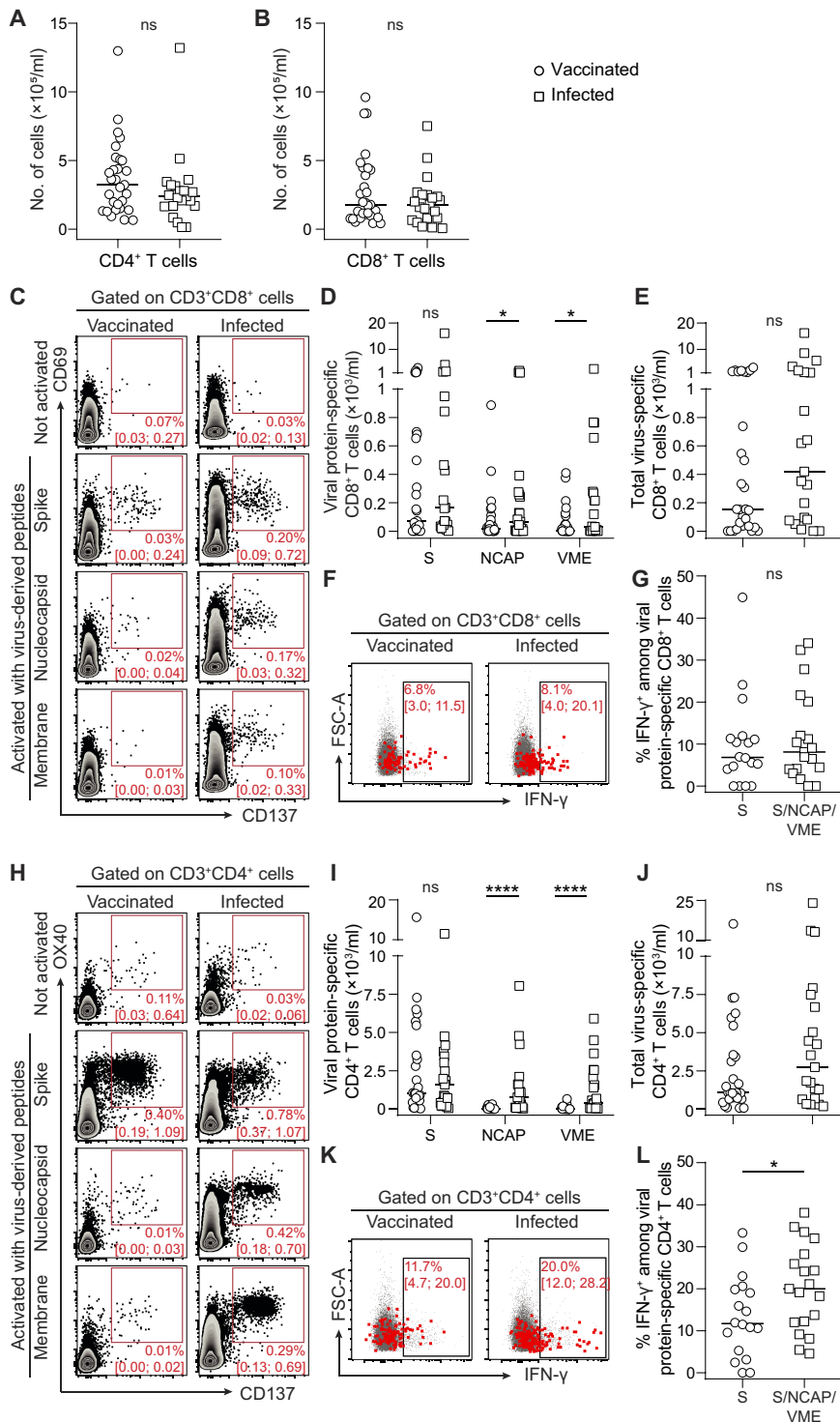
SARS-CoV-2-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses were monitored using the same approach as above (28); OX40 and CD137 were used as surface activation-induced markers on CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 2H). Comparison of CD4<sup>+</sup> and T<sub>H</sub>1 responses of vaccinated and recently infected patients resulted in the same conclusions as for CD8<sup>+</sup> T cell responses (Fig. 2, I to L).

Thus, although the repertoire of the cellular immune response directed against SARS-CoV-2 is wider in recently infected patients (Fig. 2, C, D, H, and I), the minimal increase in cellular effectors ( $P = 0.240$  for CD8<sup>+</sup> T cells, Fig. 2E;  $P = 0.158$  for CD4<sup>+</sup> T cells, Fig. 2J) is unlikely to account alone for the marked advantage in



**Fig. 1. Infection confers better protection against symptomatic COVID-19 than vaccination in transplant recipients.** Protection against COVID-19 was compared between renal transplant recipients with previous history of infection with SARS-CoV-2 (group “infected,” gray curve) and those who received the standard two-dose regimen of mRNA-1273 (group “vaccinated,” black curve). The follow-up started at the time of COVID-19 symptom onset for infected patients and at the time of the second vaccine administration for the vaccinated patients. Cumulative incidence in the two groups was plotted using the Kaplan-Meier method. Data were analyzed by a log-rank test;  $P = 0.0286$ .

**Fig. 2. SARS-CoV-2-specific cellular immunity was comparable in previously infected and vaccinated transplant recipients.** (A and B) CD4<sup>+</sup> (A) and CD8<sup>+</sup> (B) T cells were enumerated in the circulation of recently infected (*n* = 21; open squares) and vaccinated (*n* = 29; open circles) transplant recipients. (C to L) CD8<sup>+</sup> T cells (C to G) and CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1 cells (H to L) directed against the spike (S), nucleocapsid (NCAP), and membrane (VME) proteins of SARS-CoV-2 were enumerated in the circulation of recently infected and vaccinated transplant recipients. Data were background-subtracted against DMSO-negative control. (C) Flow cytometry profiles of a representative patient of each group. Median percentage and IQR are indicated. (D) The count of CD8<sup>+</sup> T cells specific to each viral protein is plotted for each patient. (E) For each patient, the total number of virus-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells is plotted. (F) Concatenated flow cytometry profiles of the two groups of patients. Median percentage and IQR are indicated. FSC-A, forward scatter area. (G) The proportion of IFN-γ-producing SARS-CoV-2-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells is plotted for each patient (infected patients, *n* = 7; vaccinated patients, *n* = 18). (H) Flow cytometry profiles of a representative patient of each group. Median percentage and IQR are indicated. (I) The count of T<sub>H</sub>1-polarized CD4<sup>+</sup> T cells specific to each viral protein is plotted for each patient. (J) For each patient, the total number of virus-specific T<sub>H</sub>1-polarized CD4<sup>+</sup> T cells is plotted. (K) Concatenated flow cytometry profiles of the two groups of patients. Median percentage and IQR are indicated. (L) The proportion of IFN-γ-producing SARS-CoV-2-specific T<sub>H</sub>1 CD4<sup>+</sup> T cells is plotted for each patient (infected patients, *n* = 7; vaccinated patients, *n* = 18). The bars indicate the median. Data were analyzed using a Mann-Whitney test; not significant (ns), *P* > 0.05; \**P* ≤ 0.05; \*\*\*\**P* < 0.0001.

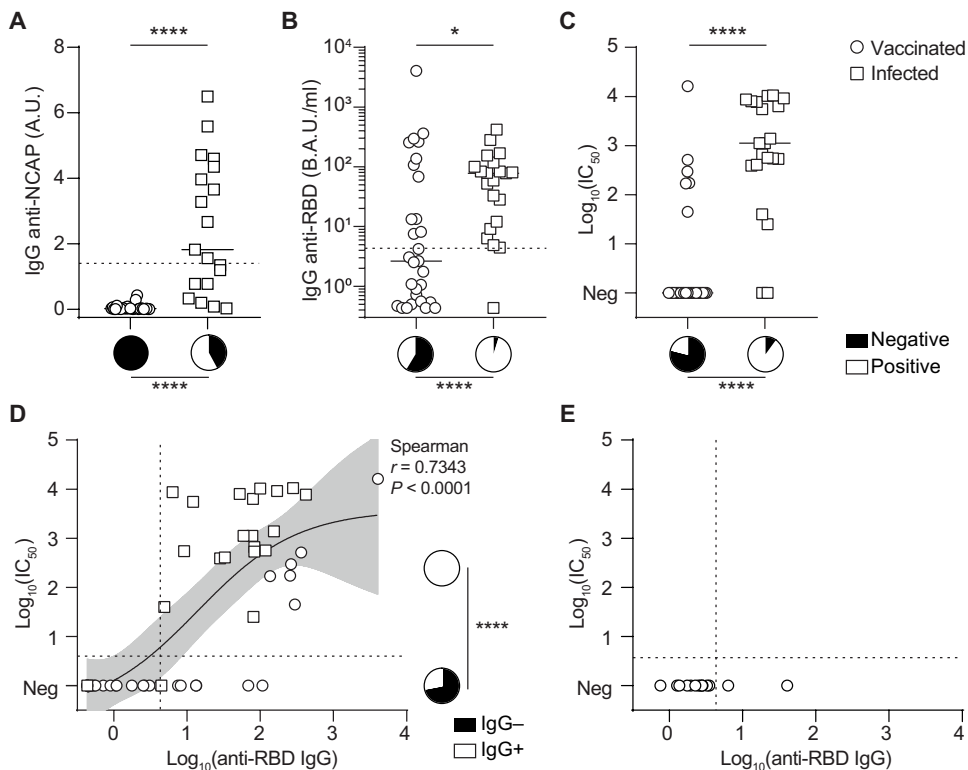


terms of protection against symptomatic COVID-19 observed in this group as compared with vaccinated transplant recipients. Another argument in favor of this hypothesis is the fact that some recently infected patients had barely detectable virus-specific T cells, suggesting that their protection was due to other types of immune effectors, a hypothesis also supported by a recently published experimental study (29).

**Presence of neutralizing IgG correlates with protection against COVID-19 in transplant recipients**

Beside cellular effectors, the adaptive immune system also generates antibodies against SARS-CoV-2. As expected, antibodies directed against viral nucleocapsid (not included in the vaccine formulation) were exclusively detected in patients from the recent infection group (Fig. 3A), but only in half of them (11 of 19, 58%). In contrast, almost all (20 of 21, 95%) recently infected transplant recipients developed anti-RBD (receptor-binding domain) IgG (immunoglobulin G) (Fig. 3B). The spike glycoprotein mediates virus entry

into target cells using the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor, and it has been shown that antibodies directed against the RBD can block viral infection of human cells in vitro and counter viral replication in vivo (30–34). Despite the fact that anti-RBD IgG titers were lower than those observed in a cohort of 30 vaccinated healthy volunteers (35), serum isolated from recently infected transplant recipients still efficiently block pseudo-virus entry in human cells in vitro (Fig. 3C). A positive correlation between anti-RBD IgG



**Fig. 3. Anti-SARS-CoV-2-specific humoral immunity elicited by infection and vaccination differs in transplant recipients.** (A and B) The titers of IgG antibodies directed against the nucleocapsid protein (A) or receptor-binding domain (B) of SARS-CoV-2 were measured in the circulation of recently infected ( $n = 21$ ; open squares) and vaccinated ( $n = 29$ ; open circles) transplant recipients. A.U., arbitrary units; B.A.U., binding antibody units. (C) The neutralizing capacity of patients' serum was compared between recently infected ( $n = 21$ ; open squares) and vaccinated ( $n = 29$ ; open circles) transplant recipients. Neutralizing titers are presented as the  $\log_{10}$  of the dilution inhibiting 50% of target infection [ $\log_{10}(\text{IC}_{50})$ ]. Neg indicates no evidence of neutralizing antibodies. For (A) to (C), the bars indicate median values. Pie charts are used to compare proportions. (D and E) The values of anti-RBD IgG titers and neutralizing capacity of the serum were log-transformed and plotted. (D) Results for the patients of the COVATRHUS cohort who were infected ( $n = 21$ ; open squares) or vaccinated ( $n = 29$ ; open circles) are plotted. The relation between the two variables was analyzed with a nonlinear regression model using a four-parameter slope. The result of Spearman correlation test is shown on the graph. The pie charts represent the proportion of patients with (white) anti-RBD IgG among those with or without neutralizing humoral response. (E) Results for the 14 patients from the epidemiological cohort, who developed COVID-19 after vaccination, are plotted. Dotted lines indicate the threshold of positivity of each assay. Mann-Whitney tests were used to compare antibody or neutralizing titers in (A) to (C), and Fisher's exact test was used to compare proportions in (A) to (D);  $*P \leq 0.05$  and  $****P < 0.0001$ .

titer and the result of the *in vitro* neutralization assay was demonstrated (Fig. 3D). In contrast with recently infected patients, the humoral response of the vaccinated group against RBD was heterogeneous, and most patients (17 of 29, 59%) failed to generate detectable anti-RBD IgG after two doses of vaccine (Fig. 3B). This defect was even more clear in the context of a pseudo-virus neutralization assay, in which only 21% of vaccinated patients had neutralizing antibody response against the pseudo-virus (6 of 29; Fig. 3C).

These findings led us to hypothesize that the lack of protection against COVID-19 in some vaccinated transplant recipients may be due to insufficient generation of neutralizing anti-RBD antibodies. To test this theory, we retrieved the 14 available serum samples collected after the two doses of mRNA-1273 but before COVID-19 diagnosis for the vaccinated patients of the epidemiological cohort. In line with our hypothesis, only 2 of 14 (14%) patients had detectable circulating anti-RBD IgG antibodies after the standard scheme of vaccination and none of these serum samples were able to block

the entry of pseudo-virus in human cells *in vitro* (Fig. 3E). Thus, the 29 vaccinated transplant recipients were distributed into the group “responder” ( $n = 6$  of 29, 21%) or “nonresponder” ( $n = 23$  of 29, 79%) to vaccine according to whether or not serum collected after two doses of mRNA-1273 vaccine showed neutralizing capacity against pseudo-virus *in vitro*. Clinical and biological characteristics of these two groups are similar and presented in Table 1.

### Generation of neutralizing antibodies after vaccination is associated with evidence of germinal center-derived B cell responses

The immunologic dogma has long held that the generation of IgG against protein antigen was dependent upon complex interactions between antigen-specific B cells and cognate  $\text{CD4}^+$  T follicular helper ( $\text{T}_{\text{FH}}$ ) cells that take place in specialized structures of secondary lymphoid organs called germinal centers (36, 37). However, this has been challenged by a number of studies (38–41). It is now clear that IgG can be generated during extrafollicular responses (which are sometimes independent of T cells).

To characterize where IgG response to COVID-19 mRNA vaccine develops, RBD-specific B cells were enumerated in the circulation of vaccinated patients and their expression of CD21, CD11c, CD27, and IgD was determined by flow cytometry (Fig. 4, A to C). Previous studies have demonstrated that the extrafollicular differentiation pathway generates an atypical population of antigen-experienced B cells that is referred to as type 2 double-negative ( $\text{IgD}^- \text{CD27}^-$ ). The latter is characterized by high expression of CD11c and low to negative expression of CD21 (42, 43). As such, they differ from their conventional germinal center-derived counterparts, which are mostly  $\text{CD27}^+$ . As expected, RBD-specific B cells were found in both higher proportion and number in the circulation of responders than nonresponders to vaccine (Fig. 4B). B cells expressing a germinal center-associated phenotype represented the vast majority (about 90%) of RBD-specific B cells in the circulation of responders to vaccine (Fig. 4C). Furthermore, their number correlated well with both the anti-RBD IgG titers (Fig. 4D) and the *in vitro* viral neutralization capacity of their serum (Fig. 4E).

### Generation of neutralizing antibodies after vaccination is associated with circulating spike protein-specific $\text{T}_{\text{FH}}$ cells

Because the humoral response to SARS-CoV-2 correlated with abundance of B cells expressing a germinal center-associated phenotype,

**Table 1. Characteristics of vaccinated patients.** IQR, interquartile range; BMI, body mass index; NA, not available; CNI, calcineurin inhibitor; MMF/MPA, mycophenolate mofetil/mycophenolic acid; imTOR, inhibitor of the mechanistic target of rapamycin; CRP, C-reactive protein.

n (%) or median [IQR]	Nonresponders	Responders	P*
	N = 23	N = 6	
Age (years)	61.2 [45.8; 70.1]	47.7 [41.2; 61.7]	0.254
Male	14 (61)	4 (67)	>0.999
BMI	24.9 [23.8; 29.4]	23.8 [20.2; 24.5]	0.138
Comorbidities			
Cardiopathy	15 (65)	6 (100)	0.138
Diabetes	3 (13)	0 (0)	>0.999
Time since transplantation (years)	7.0 [1.6; 15.9]	10.4 [3.5; 24.6]	0.414
Donor type			
Deceased	20 (87)	5 (83)	
Living	3 (13)	1 (17)	
Induction therapy			
Anti-thymocyte globulins	13 (57)	4 (67)	0.453
Basiliximab	8 (35)	1 (17)	
No induction	1 (4)	1 (17)	
NA	1 (4)	0 (0)	
Maintenance immunosuppression			
CNI (yes)	22 (96)	6 (100)	>0.999
MMF/MPA (mg/day)	1000 [500; 1000]	250 [0; 625]	0.014
Steroids (mg/day)	5.0 [0.0; 5.0]	2.5 [0.0; 5.0]	0.358
imTOR (yes)	1 (4)	2 (33)	0.100
Belatacept (yes)	1 (4)	0 (0)	>0.999
Biological data			
Lymphocytes (G/liter)	1.16 [0.99; 1.38]	1.99 [1.45; 2.66]	0.069
Monocytes (G/liter)	0.55 [0.41; 0.79]	0.51 [0.44; 0.70]	0.723
CRP (mg/liter)	4.0 [4.0; 5.8]	4.5 [4; 10.6]	0.570
Albumin (g/liter)	43 [42; 46]	44 [43; 45]	0.874
Creatinine ( $\mu$ M)	134 [97; 183]	131 [97; 237]	0.859

\*Qualitative variables were compared using a Fisher or chi-square test, and quantitative variables were compared using a Mann-Whitney test.

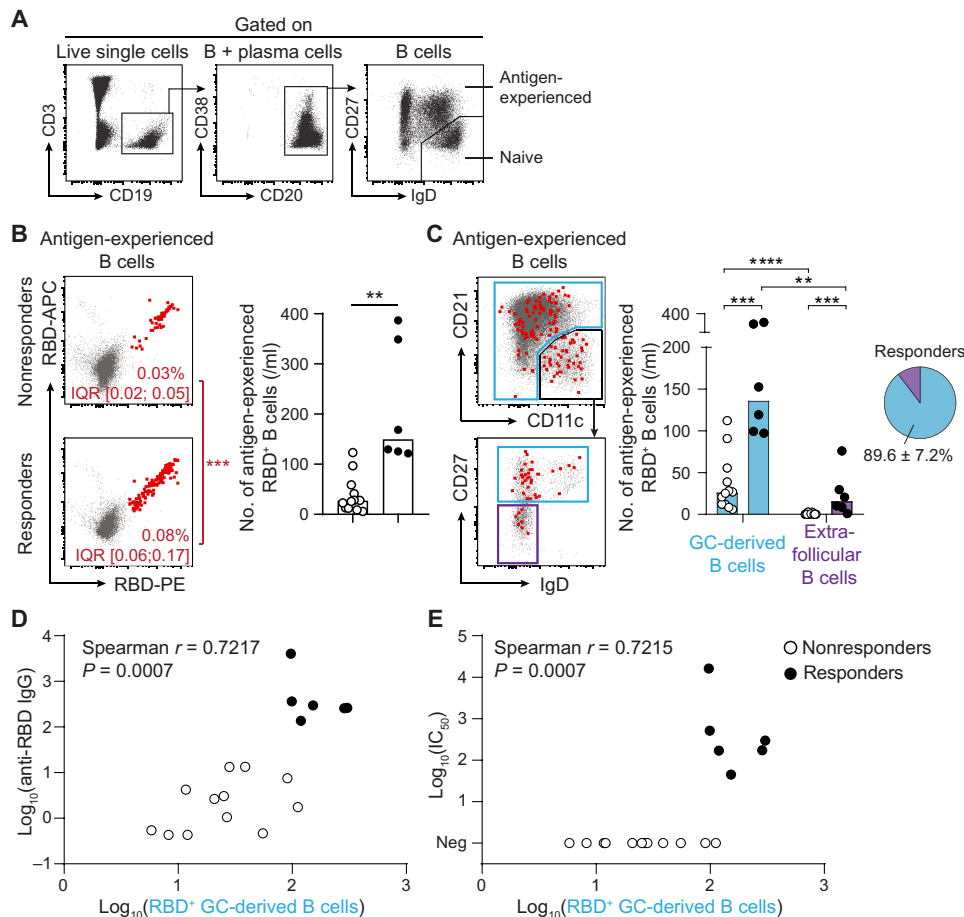
we speculated that a  $T_{FH}$  defect may be contributing to the lack of generation of neutralizing antibodies observed in some vaccinated transplant recipients, a hypothesis justified by the detrimental impact of maintenance immunosuppression on  $T_{FH}$  functions (9, 36, 44). Although  $T_{FH}$  cells act within germinal centers in secondary lymphoid organs, recent studies have demonstrated that human blood  $CXCR5^+CD4^+$  T cells are counterparts of  $T_{FH}$ . This population contains specific subsets that differentially support antibody secretion and can be identified on the basis of their profile of chemokine receptor expression (45). In line with these studies, the three subsets of  $T_{FH}$ ,  $T_{FH1}$  ( $CXCR3^+CCR6^-$ ),  $T_{FH2}$  ( $CXCR3^-CCR6^-$ ), and  $T_{FH17}$  ( $CXCR3^-CCR6^+$ ) could be identified and enumerated by flow cytometry in the circulation of vaccinated patients (Fig. 5A). No difference was observed regarding the total count of  $CD4^+$  T cells,  $T_{FH}$ , or any of the  $T_{FH}$  subsets between responders and nonresponders (Fig. 5B). However, in line with our hypothesis, all subsets of spike protein-specific  $CD4^+$  T cells were found in higher quantity in the

circulation of responders than nonresponders (Fig. 5, C and D). Moreover, a positive correlation between the total number of spike protein-specific  $T_{FH}$  and the neutralizing capacity of the sera was observed (Fig. 5E). This observation remained true when subanalyses were conducted separately with the three different subsets of  $T_{FH}$  (fig. S1). Last, a strong positive correlation was also observed between the number of germinal center-derived RBD-specific B cells and that of cognate  $T_{FH}$  cells (Fig. 5F), further emphasizing the importance of bidirectional interactions between these partners within the germinal center for an efficient response to SARS-CoV-2 vaccine.

#### High mycophenolate mofetil dose was associated with reduced vaccine response in vaccine recipients

The dynamic of germinal center reactions, in which antigen-specific B and T cells proliferate, is the major determinant controlling the humoral immune response after vaccination against SARS-CoV-2 in healthy volunteers (46, 47). The reduced count in both spike





**Fig. 4. Generation of neutralizing IgG antibodies after vaccination is associated with evidence of a germinal center reaction.** (A) Gating strategy used for flow cytometry analysis of RBD-specific B cell response. (B) RBD-specific cells were enumerated among antigen-experienced B cells in the circulation of vaccinated renal transplant recipients. Left: Concatenated flow cytometry profiles of nonresponders (upper thumbnail) and responders (lower thumbnail) to vaccine. Median percentage and IQR are indicated. Proportions of RBD-specific B cells were compared. Right: The numbers of RBD-specific antigen-experienced B cells of nonresponders ( $n = 12$ ; open circles) and responders ( $n = 6$ ; black circles) were compared. (C) The site in which the humoral response against the vaccine developed was indirectly analyzed on the basis of the phenotype of RBD-specific B cells. Extrafollicular responses are characterized by the generation of type 2 double-negative ( $CD11c^{high} CD21^{low} IgD^- CD27^-$ ) B cells (purple gate). The rest of antigen-experienced B cells (blue gates) are thought to be derived from the germinal center. Left: Concatenated flow cytometry profiles of all vaccinated patients, together with the gating strategy used for analysis. Right: Bar graphs (left) show the number of RBD-specific antigen-experienced B cells likely derived from germinal centers (GC; blue) or extrafollicular (purple) responses for nonresponders ( $n = 12$ ; open circles) and responders ( $n = 6$ ; black circles) to vaccine. The proportions of RBD-specific antigen-experienced B cells derived from germinal center and extrafollicular responses in responders to vaccine are shown in the pie chart (right). Data in (B) and (C) were analyzed using a Mann-Whitney test.  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ ;  $****P < 0.0001$ . (D and E) Correlation between the number of germinal center-derived RBD-specific antigen-experienced B cells and the titer of anti-RBD IgG (D) or the viral neutralization capacity of the serum (E). The results of Spearman correlation test are shown on the graphs.

protein-specific B and  $T_{FH}$  cells observed in nonresponders to vaccine therefore provides a potential explanation for the defect of generation of anti-RBD IgG and, in turn, the lack of viral neutralization capacity of their serum. We next asked what distinguished nonresponders from responders in our vaccinated cohort. Among the immunosuppressive drugs used in maintenance regimen, some block the activation of T cells (calcineurin inhibitor), whereas others, such as mycophenolate mofetil, act by blocking the proliferation of adaptive immune effectors. Although responders and nonresponders to vaccine were similarly exposed to calcineurin inhibitors, nonresponders

received significantly more mycophenolate mofetil (250 mg/day, IQR [0; 625] versus 1000 mg/day, IQR [500; 1000] in responders versus nonresponders;  $P = 0.014$ ; Fig. 6A).

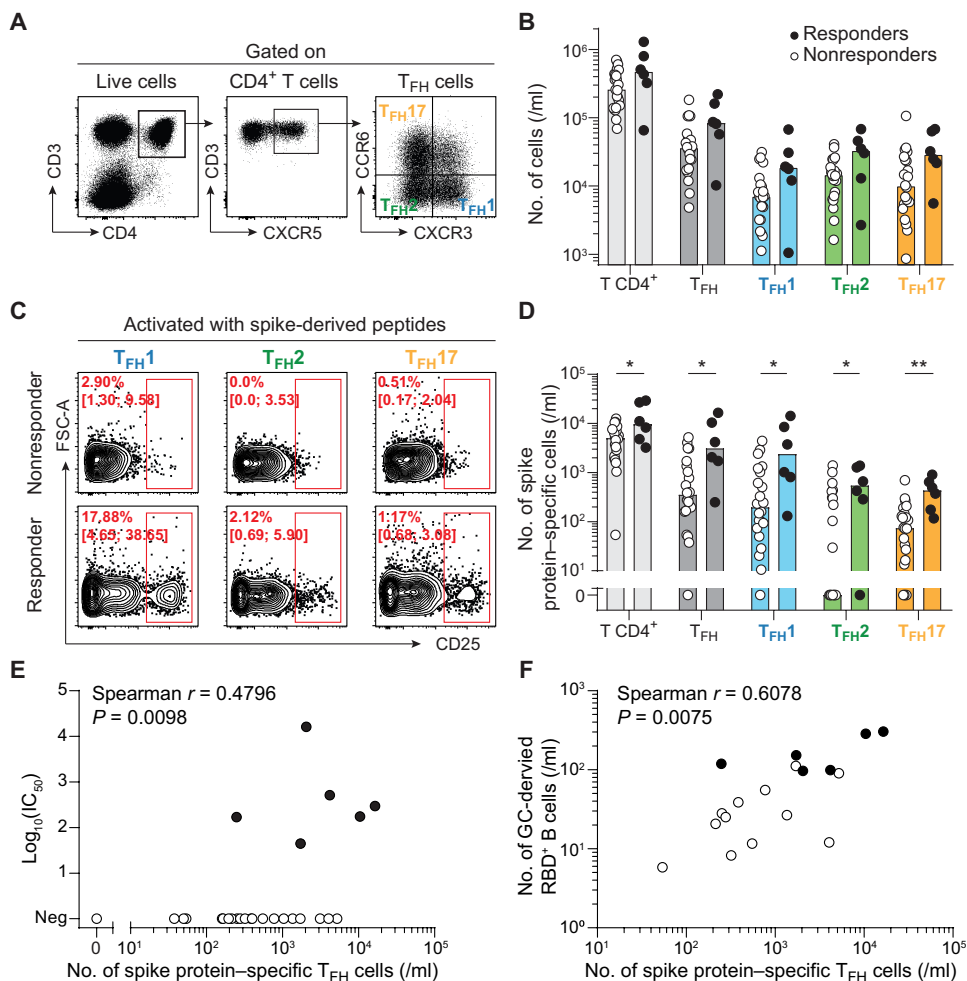
This result suggests that the antiproliferative effect of high-dose mycophenolate mofetil may impede germinal center reaction and thereby be the cause of the lack of response after two doses of mRNA-1273 vaccine observed in some transplant recipients. However, despite the fact that recently infected patients received the same (high) dose of mycophenolate mofetil at the time of infection as nonresponders to vaccine (Fig. 6A), they generated higher numbers of virus-specific germinal center-derived B cells (Fig. 6B) and  $T_{FH}$  (Fig. 6C), and consequently neutralizing anti-RBD IgG antibodies, as do responders to vaccine (Fig. 6, D and E).

### A third dose of mRNA vaccine improved neutralizing anti-RBD IgG responses in a subset of prior vaccine nonresponders

Our last observation led us to ask whether the potential negative impact of high-dose mycophenolate mofetil could be overcome by further immunogenic stimulation than the standard vaccination scheme, such as the one provided to the patients by infection with live virus. In line with this hypothesis, vaccinated patients without neutralizing anti-RBD IgG after two doses of mRNA-1273 did generate neutralizing anti-RBD IgG after infection (Fig. 7, A and B). On the basis of these results, we tested the impact of an additional dose of vaccine on the humoral response of 17 of the 23 transplant patients that were nonresponders to the standard two-dose vaccine regimen for mRNA-1273. In accordance with our hypothesis, not only we observed an increase in anti-RBD IgG titers after the third dose of vaccine (Fig. 7C) but also 41% of the serum

samples (7/17) efficiently block pseudo-virus entry in human cells in vitro (Fig. 7D).

We next validated these findings in an independent, external cohort. A third dose of the other currently approved mRNA SARS-CoV-2 vaccine (BNT162b2) was administered to a cohort of 62 renal transplant recipients from Lyon University Hospital that did not have neutralizing anti-RBD IgG after two doses of vaccine. In accordance with our previous results with mRNA-1273, we observed a similar increase in anti-RBD IgG titers in these nonresponders after the third dose of vaccine (Fig. 7E), and serum from 39% (24 of 62)



**Fig. 5. Generation of neutralizing antibodies after vaccination correlates with the number of spike protein-specific T<sub>H</sub> cells.** Follicular helper T (T<sub>FH</sub>) cells were enumerated in the circulation of responders (*n* = 6; black circles) and nonresponders (*n* = 22; open circles) after two doses of SARS-CoV-2 mRNA vaccine. (A) Representative flow cytometry profiles with the gating strategy used to identify the three subsets of T<sub>FH</sub> cells: T<sub>FH</sub>1 (blue), T<sub>FH</sub>2 (green), and T<sub>FH</sub>17 (orange). (B) The counts of circulating CD4<sup>+</sup> T cell subsets are plotted for each patient. (C and D) Spike protein-specific cells were enumerated among each CD4<sup>+</sup> T cell subset for each vaccinated patient. Data were background-subtracted against a DMSO-only negative control. (C) Representative flow cytometry profiles of nonresponders (upper row) and responders (lower row). Median percentage and IQR are indicated. (D) The counts of circulating spike protein-specific CD4<sup>+</sup> T cell subsets are plotted for each patient. Bars indicate median values. Data in (D) were compared using Mann-Whitney tests. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01. (E) Correlation between the number of spike protein-specific T<sub>FH</sub> cells and viral neutralization capacity of the serum. The result of Spearman correlation test is shown on the graph. (F) Correlation between the number of spike protein-specific T<sub>FH</sub> cells and germinal center-derived RBD-specific antigen-experienced B cells. The result of Spearman correlation test is shown on the graph.

of recipients efficiently blocked pseudo-virus entry in human cells in vitro (Fig. 7F).

**DISCUSSION**

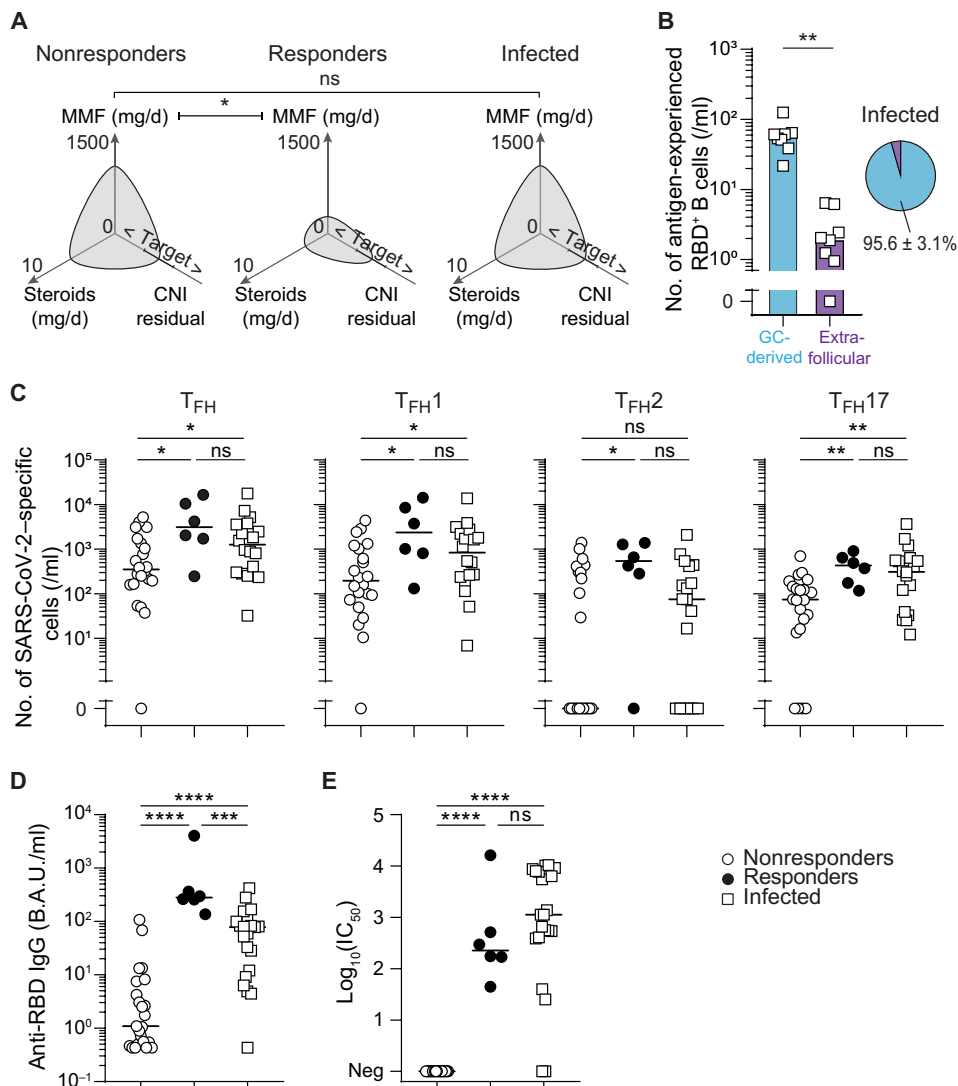
Although antibody titers and their ability to neutralize the virus are emerging as correlates of protection against COVID-19 in healthy individuals (48–50), there is still an urgent need to understand the relative contribution of humoral and T cell immunity in conferring protection to immunosuppressed populations (18), in particular transplant patients, who are both at high risk of death due to COVID-19 (3–7) and poor responders to mRNA vaccines (11–14, 51).

Taking advantage of the observation that a previous infection by SARS-CoV-2, but not the standard two-dose scheme of vaccination, provided protection against symptomatic COVID-19 to transplant recipients, we designed a translational study to compare the adaptive immune responses of these two groups of patients. The results of this study suggest that germinal center-derived anti-SARS-CoV-2-neutralizing IgG may be a critical component of the adaptive immune response associated with protection against symptomatic COVID-19 in transplant recipients. Our data also suggest that the negative impact of mycophenolate mofetil on response to vaccine may be overcome by increasing antigen exposure with a third dose.

Newer studies have challenged a long-standing dogma in immunology, which considered switched antibodies directed against protein antigens (such as spike protein) a hallmark of germinal center reactions. For example, recent experimental works have demonstrated that T cell-independent IgG class switching can also occur, in particular against certain outer membrane proteins of pathogens (39, 40). Additional studies have shown that, during T cell-dependent humoral response, IgG class switching is triggered before differentiation into germinal center B cells (38). Last, it has been demonstrated that IgG class switching can also take place during an extrafollicular (and thus germinal center-independent) differentiation pathway that is promoted by inflammatory conditions (41), including in the particular setting of severe COVID-19 (52). Our observation that the generation of virus-neutralizing IgG in responders to vaccination correlated with both the number of antigen-specific germinal center B cells and T<sub>FH</sub> cells may indicate that the

response to SARS-CoV-2 mRNA vaccine requires germinal center reactions in renal transplant recipients, as has been recently reported for immunocompetent healthy volunteers (46).

Interestingly, serum neutralization capacity and antigen-specific germinal center B cells after vaccination correlate not only with the number of antigen-specific T<sub>FH</sub>1 cells, the subset predominantly produced after vaccination in healthy participants (53, 54), but also with the two other T<sub>FH</sub> subsets (T<sub>FH</sub>2 and T<sub>FH</sub>17). These populations are thought to be the most efficient to drive antibody generation (9, 45). This latter finding, which conflicts with the negative correlation recently reported after infection between the number of T<sub>FH</sub>17 cells and the neutralizing antibody response (55), could



**Fig. 6. High mycophenolate mofetil dose was associated with evidence of poorer vaccination-induced germinal center reactions.** (A) Polar plots were used to compare maintenance immunosuppression regimens for nonresponders ( $n = 23$ ; left) and responders ( $n = 6$ ; middle) to two doses of SARS-CoV-2 mRNA vaccine, and patients previously infected with SARS-CoV-2 ( $n = 21$ ; right). Median values are plotted. MMF, mycophenolate mofetil; CNI, calcineurin inhibitor. Target indicates the target residual blood concentration of calcineurin inhibitor. < and > symbols indicate residual blood concentrations of calcineurin inhibitor below or above the target, respectively. (B) The bar graph (left) shows the number of RBD-specific antigen-experienced B cells thought to be derived from germinal center (blue) and extra-follicular (purple) responses of each recently infected patient ( $n = 8$ ; open squares). The proportions of RBD-specific antigen-experienced B cells likely derived from germinal center and extrafollicular responses in recently infected patients are shown in the pie chart (right). (C) SARS-CoV-2-specific  $T_{FH}$  subsets were enumerated in the circulation of nonresponders ( $n = 22$ ; open circles) and responders ( $n = 6$ ; black circles) to two doses of SARS-CoV-2 mRNA vaccine, as well as for patients recently infected with SARS-CoV-2 ( $n = 18$ ; open squares). (D) The titers of anti-RBD antibodies were measured in the circulation for nonresponders ( $n = 23$ ; open circles) and responders ( $n = 6$ ; black circles) to two doses of SARS-CoV-2 mRNA vaccine, as well as for patients recently infected with SARS-CoV-2 ( $n = 21$ ; open squares). (E) The neutralizing capacity of patients' serum was compared for nonresponders ( $n = 23$ ; open circles) and responders ( $n = 6$ ; black circles) to two doses of SARS-CoV-2 mRNA vaccine, as well as for patients recently infected with SARS-CoV-2 ( $n = 21$ ; open squares). Neutralizing titers are presented as  $\log_{10}(IC_{50})$ . Bars indicate the median. Data were analyzed by Mann-Whitney tests; ns,  $P > 0.05$ ; \* $P \leq 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.01$ ; \*\*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\*\* $P < 0.0001$ .

indicate that efficient germinal center response to infection and vaccination requires different  $T_{FH}$  subpopulations.

It is not clear what factors impair germinal center reaction in nonresponders to SARS-CoV-2 mRNA vaccine. We observed that

transplant patients without viral neutralizing IgG after two doses of vaccine were exposed to a higher dose of mycophenolate mofetil, an immunosuppressive drug that acts by blocking proliferation of activated B and T lymphocytes (56, 57). This observation is supported by other independent studies, which have also reported an association between exposition to mycophenolate mofetil and lower antibody responses (44, 58, 59), including to SARS-CoV-2 vaccines (11, 14). On the basis of these findings, it is tempting to speculate that a reduction (or suspension) of the maintenance dose of mycophenolate mofetil before vaccination might help obtain better response rates. On the other hand, this non-antigen-specific attitude might increase the risk of generation of donor-specific antibodies (9), which is the first cause of late allograft loss (60) through accelerated chronic vascular rejection (61, 62).

On the basis of the observation that recently infected patients successfully generated viral neutralizing IgG despite a high dose of mycophenolate mofetil, similar to that of nonresponders, we hypothesized that an additional exposure to viral antigen in the form of a third dose of vaccine could improve a patient's protection without requiring the reduction of maintenance immunosuppression. In line with this hypothesis, administration of a third dose of mRNA vaccine resulted in the generation of neutralizing anti-RBD IgG in about 40% of individuals who did not respond to the standard two-dose course of vaccination. This result was further validated in a larger independent prospective cohort with the other approved SARS-CoV-2 mRNA vaccines and has been reported by independent groups (15, 63–66). Furthermore, our group recently reported that a fourth dose of an mRNA-based vaccine produces a satisfactory antibody response in some kidney transplant recipients who did not respond adequately after three previous doses (67).

In addition to increasing the number of vaccinations, another possibility to increase vaccine immunogenicity is to increase the amount of antigen provided

in each dose. This strategy has been successfully tested in transplant recipients with protein-based vaccines against influenza (68, 69). In this regard, note that several studies have already reported higher antibody titers in healthy patients vaccinated with

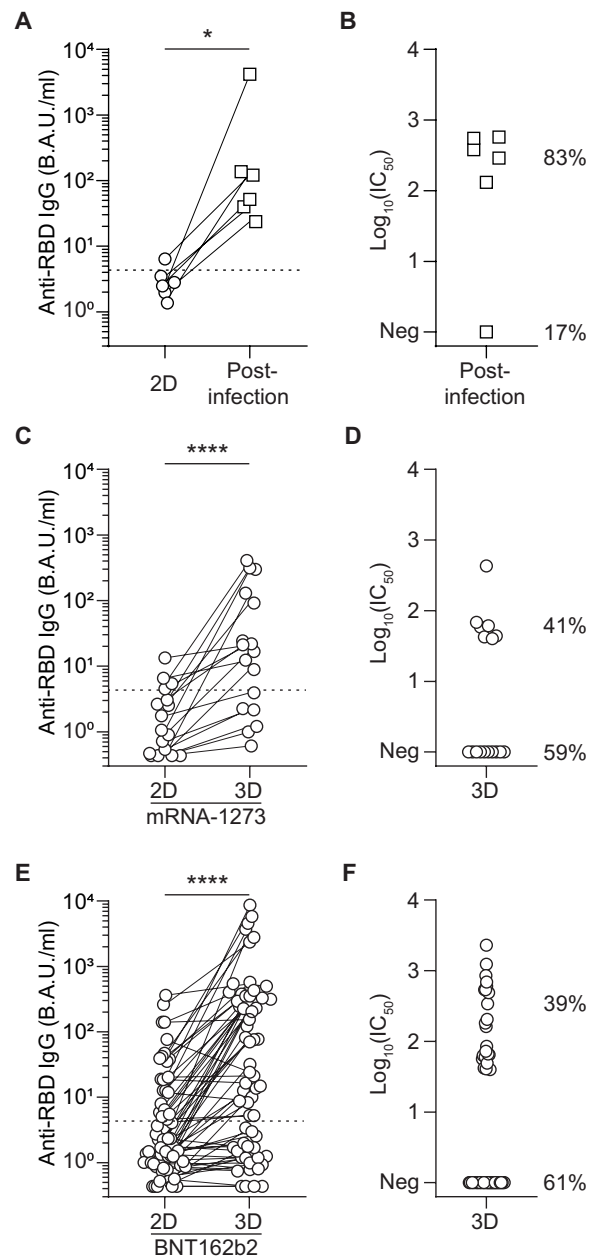
**Fig. 7. Infection after vaccination or a third dose of mRNA vaccination improves SARS-CoV-2-specific antibody responses.** (A) Anti-RBD IgG titers were measured before and after SARS-CoV-2 infection in individuals who received two doses (2D) of mRNA vaccine ( $n = 6$ ). (B) Virus neutralization capacity of the serum was measured after SARS-CoV-2 infection in transplant recipients who did not respond to two doses of mRNA vaccine ( $n = 6$ ). Percentages indicate the fraction of individuals with (83%) or without (17%) measurable neutralizing titers after two doses of vaccine and SARS-CoV-2 infection. (C) A discovery cohort (mRNA-1273 vaccine;  $n = 17$ ) was used to compare anti-RBD IgG titers after the second (2D) and third (3D) dose of mRNA vaccine in those who were nonresponders after two doses of mRNA-1273 vaccine. (D) Virus neutralization capacity of the patients' serum was measured after the third dose ( $n = 17$ ). Percentages indicate the fraction of individuals with (41%) or without (59%) measurable neutralizing titers after three doses of mRNA-1273 vaccine. (E) An external validation cohort (BNT162b2 vaccine;  $n = 62$ ) was used to compare anti-RBD IgG titers after the second (2D) and third (3D) dose of mRNA vaccine in those who were nonresponders to two doses of BNT162b2 mRNA vaccine. (F) Virus neutralization capacity of the patients' serum was measured after the third dose ( $n = 62$ ). Percentages indicate the fraction of individuals with (39%) or without (61%) measurable neutralizing titers after three doses of BNT162b2 vaccine. Wilcoxon test,  $*P < 0.05$  and  $****P < 0.0001$ .

mRNA-1273 (which contains 100  $\mu\text{g}$  of mRNA) than in those that received BNT162b2 (30  $\mu\text{g}$  of mRNA) (70), although whether one vaccine is more effective than the other in this cohort remains to be evaluated.

The process of adapting vaccination regimens has limits. A fraction of transplanted patients will likely not be able to generate an efficient antibody response whatever the vaccination scheme. In this cohort, protection against COVID-19 might depend on infusion of cocktails of therapeutic or prophylactic monoclonal antibodies (mAbs). This primary prevention strategy has been successfully tested in people with household exposure to SARS-CoV-2 with the combination of casirivimab and imdevimab (REGEN-COV) (71). In this study, mAb infusion reduced the risk of developing symptomatic and asymptomatic COVID-19 and also reduced the duration of symptoms. Further studies evaluating this strategy of passive immunization in organ transplant recipients are essential to protecting this at-risk population.

This study has several limitations. First, only a limited number of patients were enrolled ( $n = 50$ ), the immune response of whom was analyzed at only a single time point. Second, the impact of vaccination or infection on the various immune cell subsets was analyzed in peripheral blood instead of the secondary lymphoid organs (spleen and lymph nodes), where immune responses actually develop. This limitation made it impossible to directly evaluate the formation of germinal centers in responders to vaccines and during mild-to-moderate COVID-19 disease. Third, these data were collected before the emergence of the omicron variant, which is currently the dominant circulating variant of concern. Last, we did not directly test the hypothesis that stopping mycophenolate mofetil would allow for better expansion of antigen-specific B and T cells and thereby an improved response rate to vaccination. Thus, future studies to investigate causal relationships between these parameters are needed.

In conclusion, our study suggests that the protection of renal transplant recipients against severe COVID-19 depends upon the



germinal center-dependent generation of virus-neutralizing IgG antibodies. In contrast with SARS-CoV-2 infection, which efficiently drives protective humoral response, the standard two-dose regimen of mRNA vaccine might be insufficient in some transplant patients treated with immunosuppressive drugs. Thus, these patients may require additional booster dose(s) of mRNA vaccine.

## MATERIALS AND METHODS

### Study design

A monocentric epidemiological cohort of kidney transplant patients was used to retrospectively compare the incidence of symptomatic



SARS-CoV-2 infections in patients vaccinated against SARS-CoV-2 with two doses of mRNA vaccine versus patients with a previous history of COVID-19. A cohort of 50 patients (21 recently infected and 29 vaccinated, COVATRHUS cohort) was extracted from this initial cohort for in-depth retrospective analysis of their cellular and humoral immune responses against SARS-CoV-2. The impact of a third dose of mRNA vaccine was first evaluated in the nonresponders of COVATRHUS cohort ( $n = 23$ ) and then in an external validation cohort ( $n = 62$ ) in a prospective observational study.

### Characteristics of study populations

The incidence of SARS-CoV-2 infections was monitored since the beginning of the pandemic, in the entire cohort of kidney transplant recipients at the University Hospital of Strasbourg, France, and compared between patients with a previous history of COVID-19 and those who received the two doses of mRNA-1273. The follow-up started at the time of COVID-19 symptom onset for the infected patients. For vaccinated transplant recipients, because the protection conferred by mRNA vaccine is operant as early as 12 days after the first injection in the general population (72), the follow-up started at the date of the second dose of vaccine. The Kaplan-Meier method was used to compare COVID-19 incidence in the two populations. Data were censored at either date of death or 10 October 2021. Furthermore, to ensure the accuracy of the comparison, infected patients who did not develop reinfection before immunization were censored at the time of their first mRNA vaccine injection. Also, because in France a systematic third vaccine dose was proposed to all transplant recipients from April 11th onward, vaccinated patients who did not develop COVID-19 before their third dose of vaccine were censored at the time of the third vaccine injection.

The COVATRHUS cohort was used to analyze immune mechanisms involved in protection against COVID-19. Twenty-nine patients, naive for SARS-CoV-2 infection, were prospectively recruited from the cohort of kidney transplant recipients of the University Hospital of Strasbourg. According to the recommendations of the French health authority, they received two doses of mRNA-1273 (Moderna) SARS-CoV-2 vaccine. A third vaccine injection of mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine was offered to all patients who did not develop viral neutralizing IgG after the second dose.

Vaccinated patients were compared to 21 patients retrospectively recruited among adult kidney transplant recipients of the University Hospital of Strasbourg, who were diagnosed with COVID-19 between 1 November 2020 and 31 January 2021. The diagnosis of COVID-19 was based on positive testing of nasopharyngeal swabs by reverse transcription PCR (RT-PCR). The study protocol complied with the tenets of the Helsinki Declaration and was approved by the Institutional Review Board (approval number: 18/21 03, Comité de Protection des Personnes Ouest IV Nantes) and registered on clinicaltrials.gov as NCT04757883. Clinical, demographic, and laboratory data were collected at the time of the first vaccine injection or at the time of the COVID-19 diagnosis. Severity of COVID-19 was graded as asymptomatic, mild, moderate, severe, critical, or death following the first WHO recommendations dated 27 May 2020. The immune response after vaccination or infection was assessed at day 14 after the second dose of vaccine or 1 month after symptom onset, respectively.

An external validation cohort consisted of nonresponders to two doses of BNT162b2 vaccine (Pfizer-BioNTech). These individuals were part of a cohort of kidney transplant recipients of

Lyon University Hospital, France. The study protocol was approved by the local Institutional Review Board (approval number: 2020-A02918-31).

### Assessment of cellular immune responses directed against SARS-CoV-2

PBMCs were collected and isolated by centrifugation on a Ficoll density gradient. The cells were then frozen in fetal calf serum supplemented with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich). SARS-CoV-2-specific CD8<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> T cells were identified as previously described (9, 28). Briefly, after thawing, cells were concentrated at 10<sup>7</sup> cells/ml in complete medium [RPMI 1640 GlutaMAX medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum, 25 mM Hepes (Invitrogen), and penicillin/streptomycin (10 U/ml; Invitrogen)] and left to rest overnight at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in a 96-well round-bottom plate at 10<sup>6</sup> cells per well. The next day, the RPMI 1640 medium was changed, and the cells were cultured for 24 hours in the presence of peptide pools derived from the viral spike, nucleocapsid, and membrane proteins (PepMix, JPT Peptides Technologies GmbH). The pools contained overlapping peptides covering the entire sequence of the indicated viral protein antigens. The final concentration of the peptides was 1 µg/ml. Cells cultured with DMSO (Sigma-Aldrich) alone (1:250) were used as negative controls. Cells were then rinsed and incubated at room temperature with the relevant fluorescent antibodies for 30 min: CD3 (UHCT1, Brilliant Violet 421, dilution 1:80, BD Biosciences, catalog no. 562426, RRID: AB\_11152082), CD8 [SK1, allophycocyanin (APC)-H7, dilution 1:80, BD Biosciences, catalog no. 560179, RRID: AB\_1645481], CXCR3 (1C6, Alexa Fluor 488, dilution 1:10, BD Biosciences, catalog no. 558047, RRID: AB\_397008), CXCR5 (RF8B2, Alexa Fluor 647, dilution 1:80, BD Biosciences, catalog no. 558113, RRID: AB\_2737606), CCR6 [11A9, phycoerythrin (PE)-cyanine (Cy) 7, dilution 1:80, BD Biosciences, catalog no. 560620, RRID: AB\_1727440], CD25 (2A3, PE, dilution 1:50, BD Biosciences, catalog no. 341011, RRID: AB\_2783790), CD4 [SK3, peridinin-chlorophyll-protein (PerCP)-Cy5.5, dilution 1:20, BD Biosciences, catalog no. 332772, RRID: AB\_2868621, or Alexa Fluor 488, dilution 1:10, BioLegend, catalog no. 344604, RRID: AB\_1937227], CD69 (FN50, PE/Dazzle 594, dilution 1:150, BioLegend, catalog no. 310942, RRID: AB\_2564277), CD137 (4B4-1, Alexa Fluor 647, dilution 1:20, BioLegend, catalog no. 309824, RRID: AB\_2566258), and a Fixable Viability Dye (eBioscience, eFluor 510, dilution 1:500). Cells were fixed with 2% methanol-free formaldehyde.

For IFN-γ staining, surface antigen-stained cells were incubated for 30 min at 4°C in Fixation/Permeabilization buffer (Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set from eBioscience). The cells were then rinsed and incubated with anti-IFN-γ fluorescent antibody (4S.B3, PE, dilution 1:10, BD Biosciences, catalog no. 554552, RRID: AB\_395474) in the permeabilization buffer according to manufacturer instructions. Of note, these experiments were performed without brefeldin A. Samples were acquired on a BD LSR Fortessa 4L flow cytometer (BD Biosciences).

### Assessment of humoral immune responses directed against SARS-CoV-2

IgGs directed against the receptor-binding domain (anti-RBD IgG) of the spike glycoprotein of the SARS-CoV-2 were detected by a chemiluminescence technique, using the Maglumi SARS-CoV-2S-RBD IgG test (Snibe Diagnostic) on a Maglumi 2000 analyzer

(Snibe Diagnostic), according to the manufacturer's instructions. This test displays clinical sensitivity and specificity of 100 and 99.6%, respectively. Following WHO recommendation (73), titers are expressed as binding antibody units per milliliter (BAU/ml); the correction factor for Maglumi was 4.33.

The Abbott anti-nucleocapsid (N) IgG assay is an automated chemiluminescence microparticle immunoassay (CMIA) conducted and interpreted according to manufacturer guidelines. A sample-to-calibrator relative light unit index of  $\geq 1.4$  is considered positive, an index of  $\geq 0.49$  to  $< 1.40$  is considered borderline, and an index of  $< 0.49$  is considered negative. This CMIA displays clinical sensitivity and specificity of 96.5 and 99.2%, respectively (74).

Neutralization assays were performed as follows:  $3 \times 10^4$  293T-ACE2 (provided by O. Schwartz laboratory, Institut Pasteur) were plated in 96-well plates. Serum samples were sequentially diluted and incubated with D614G spike-pseudotyped lentiviral particles (provided by Rossolillo laboratory, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire) for 1 hour at 37°C. The mixes were then added to cells. After 72 hours, the intracellular luciferase signal was measured with Bright-Glo luciferase assay system using a luminescence Counter MicroBetaTriLux 1450LSC (PerkinElmer). The percentage of neutralization was calculated as follows:  $100 \times (1 - (\text{mean}(\text{luciferase signal in sample duplicate}) / (\text{mean}(\text{luciferase signal in virus alone}))))$ . The results are reported as the  $\log_{10}$  of the dilutions that inhibit 50% of the infection of the targets [ $\log_{10}(\text{IC}_{50})$ ].

SARS-CoV-2 RBD-specific B cells were identified as previously reported (75). Briefly, biotinylated recombinant RBD domain of SARS-CoV-2 RBD (Miltenyi Biotec) was tetramerized with either streptavidin-PE (BD Biosciences) or streptavidin-APC (BioLegend). Cryopreserved PBMCs were centrifuged, suspended in PEB buffer (phosphate-buffered saline plus 0.5% bovine serum albumin and 2 mM EDTA), and incubated with Fc receptor block (Miltenyi Biotec) for 15 min at 4°C (dilution 1:10). Next, cells were washed in PEB and stained for 30 min in brilliant stain buffer at 4°C in the dark using the following antibodies: anti-CD3 (clone SK7, APC-Fire810, dilution 1:25, BioLegend, catalog no. 344858, RRID: AB\_2860895), anti-CD11c (clone 3.9, Brilliant Violet 785, dilution 1:20, BioLegend, catalog no. 301644, RRID: AB\_2565779), anti-IgD (clone IA6-2, Brilliant Violet 605, dilution 1:50, BioLegend, catalog no. 348232, RRID: AB\_2563337), anti-CD19 (clone LT19, PE-Vio770, dilution 1:50, Miltenyi Biotec, catalog no. 130-113-170, RRID: AB\_2733209), anti-CD27 (clone M-T271, PerCP-Vio700, dilution 1:50, Miltenyi Biotec, catalog no. 130-113-632, RRID: AB\_2784096), anti-CD38 (clone REA572, VioBright fluorescein isothiocyanate, dilution 1:25, Miltenyi Biotec, catalog no. 130-113-433, RRID: AB\_2726165), anti-CD20 (clone 2H7, Brilliant Violet 421, dilution 1:25, BD Biosciences, catalog no. 562873, RRID: AB\_2737857), and anti-CD21 (clone B-ly4, Brilliant Ultra-Violet 496, dilution 1:100, BD Biosciences, catalog no. 750614, RRID: AB\_2874746), together with both PE- and APC-conjugated recombinant RBD tetramers. Cells were washed in PEB and resuspended in a PEB dilution (1:500) of the fixable viability dye eFluor 780 (eBioscience, eFluor 780, dilution 1:500). They were next washed and fixed at 4% paraformaldehyde for 20 min at 4°C in the dark before a final wash and resuspension for analysis. Samples were then acquired on a Cytex Aurora spectral flow cytometer equipped with five lasers operating on 355, 405, 488, 561, and 640 nm using the SpectroFlo V2.2.0 (Cytex) software. Data were analyzed using FlowJo10.6.1 software (Becton Dickinson). Because our interest was on the ongoing humoral immune response

(antigen-experienced B cells), we excluded naive B cells ( $\text{CD19}^+ \text{CD20}^+ \text{IgD}^+ \text{CD27}^-$ ) from analysis.

### Statistical analysis

Raw, individual-level data for experiments where  $n < 20$  are presented in data file S1. All the analyses were carried out using GraphPad Prism v8.0. Qualitative variables were expressed as percentages and compared with the chi-square test or Fisher's exact test when the conditions of application of chi-square were not met. Because of the lack of normal distribution of some variables in the epidemiological cohort or small sample size in the mechanistic cohort, quantitative variables were all expressed as median  $\pm$  IQR and compared using Mann-Whitney test. Paired data were compared using Wilcoxon test. All tests were two-sided. Incidence data were analyzed by Kaplan-Meier plot and compared using a log-rank test. Nonlinear regression was performed to study the correlation of continuous quantitative variables.

### SUPPLEMENTARY MATERIALS

[www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.abl6141](http://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.abl6141)

Fig. S1

Table S1

Data file S1

MDAR Reproducibility Checklist

[View/request a protocol for this paper from Bio-protocol.](#)

### REFERENCES AND NOTES

1. N. Zhu, D. Zhang, W. Wang, X. Li, B. Yang, J. Song, X. Zhao, B. Huang, W. Shi, R. Lu, P. Niu, F. Zhan, X. Ma, D. Wang, W. Xu, G. Wu, G. F. Gao, W. Tan; China Novel Coronavirus Investigating and Research Team, A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **382**, 727–733 (2020).
2. European Centre for Disease Prevention and Control, COVID-19 situation update worldwide, as of week 1, updated 13 January 2022; [www.ecdc.europa.eu/en/geographical-distribution-2019-ncov-cases](http://www.ecdc.europa.eu/en/geographical-distribution-2019-ncov-cases).
3. E. J. Williamson, A. J. Walker, K. Bhaskaran, S. Bacon, C. Bates, C. E. Morton, H. J. Curtis, A. Mehrkar, D. Evans, P. Inglesby, J. Cockburn, H. I. McDonald, B. MacKenna, L. Tomlinson, I. J. Douglas, C. T. Rentsch, R. Mathur, A. Y. S. Wong, R. Grieve, D. Harrison, H. Forbes, A. Schultze, R. Croker, J. Parry, F. Hester, S. Harper, R. Perera, S. J. W. Evans, L. Smeeth, B. Goldacre, Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature* **584**, 430–436 (2020).
4. S. Caillard, D. Anglicheau, M. Matignon, A. Durrbach, C. Greze, L. Frimat, O. Thauinat, T. Legris, V. Moal, P. F. Westeel, N. Kamar, P. Gatault, R. Snanoudj, A. Sicard, D. Bertrand, C. Colosio, L. Couzi, J. M. Chemouny, C. Masset, G. Blanco, J. Bamouli, A. Duveau, N. Bouvier, N. Chavarot, P. Grimbert, B. Moulin, Y. Le Meur, M. Hazzan; French SOT COVID Registry, An initial report from the French SOT COVID Registry suggests high mortality due to COVID-19 in recipients of kidney transplants. *Kidney Int.* **98**, 1549–1558 (2020).
5. K. J. Jager, A. Kramer, N. C. Chesnaye, C. Couchoud, J. E. Sánchez-Álvarez, L. Garneata, F. Collart, M. H. Hemmelder, P. Ambühl, J. Kerschbaum, C. Legeai, M. D. Del Pino Y Pino, G. Mircescu, L. Mazzoleni, T. Hoekstra, R. Winzeler, G. Mayer, V. S. Stel, C. Wanner, C. Zoccali, Z. A. Massy, Results from the ERA-EDTA Registry indicate a high mortality due to COVID-19 in dialysis patients and kidney transplant recipients across Europe. *Kidney Int.* **98**, 1540–1548 (2020).
6. O. Thauinat, C. Legeai, D. Anglicheau, L. Couzi, G. Blanco, M. Hazzan, M. Pastural, E. Savoye, F. Bayer, E. Morelon, Y. Le Meur, O. Bastien, S. Caillard; French nationwide Registry of Solid Organ Transplant Recipients with COVID-19, IMPact of the COVID-19 epidemic on the mortality of kidney transplant recipients and candidates in a French Nationwide registry sTudy (IMPORTANT). *Kidney Int.* **98**, 1568–1577 (2020).
7. S. Caillard, N. Chavarot, H. Francois, M. Matignon, C. Greze, N. Kamar, P. Gatault, O. Thauinat, T. Legris, L. Frimat, P. F. Westeel, V. Goutaudier, M. Jdidou, R. Snanoudj, C. Colosio, A. Sicard, D. Bertrand, C. Mousson, J. Bamouli, C. Masset, A. Thierry, L. Couzi, J. M. Chemouny, A. Duveau, V. Moal, G. Blanco, P. Grimbert, A. Durrbach, B. Moulin, D. Anglicheau, Y. Ruch, C. Kaeuffer, I. Benotmane, M. Solis, Y. Le Meur, M. Hazzan, F. Danion; French SOT COVID Registry, Is COVID-19 infection more severe in kidney transplant recipients? *Am. J. Transplant.* **21**, 1295–1303 (2021).
8. Haute Autorité de Santé, Vaccins Covid-19: Quelle stratégie de priorisation à l'initiation de la campagne?; [www.has-sante.fr/jcms/p\\_3221237/fr/vaccins-covid-19-quelle-strategie-de-priorisation-a-l-initiation-de-la-campagne](http://www.has-sante.fr/jcms/p_3221237/fr/vaccins-covid-19-quelle-strategie-de-priorisation-a-l-initiation-de-la-campagne).

9. S. Dahdal, C. Saison, M. Valette, E. Bachy, N. Pallet, B. Lina, A. Koenig, G. Monneret, T. Defrance, E. Morelon, O. Thanaat, Residual activatability of circulating Tfh17 predicts humoral response to thymodependent antigens in patients on therapeutic immunosuppression. *Front. Immunol.* **9**, 3178 (2019).
10. A. Duchini, J. A. Goss, S. Karpen, P. J. Pockros, Vaccinations for adult solid-organ transplant recipients: Current recommendations and protocols. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 357–364 (2003).
11. B. J. Boyarsky, W. A. Werbel, R. K. Avery, A. A. R. Tobian, A. B. Massie, D. L. Segev, J. M. Garonzik-Wang, Antibody response to 2-dose SARS-CoV-2 mRNA vaccine series in solid organ transplant recipients. *JAMA* **325**, 2204–2206 (2021).
12. H. Rincon-Arevalo, M. Choi, A.-L. Stefanski, F. Halleck, U. Weber, F. Szelinski, B. Jahrsdörfer, H. Schrezenmeier, C. Ludwig, A. Sattler, K. Kotsch, A. Potekhin, Y. Chen, G. R. Burmester, K.-U. Eckardt, G. M. Guerra, P. Durek, F. Heinrich, M. Ferreira-Gomes, A. Radbruch, K. Budde, A. C. Lino, M.-F. Mashreghi, E. Schrezenmeier, T. Dörner, Impaired humoral immunity to SARS-CoV-2 BNT162b2 vaccine in kidney transplant recipients and dialysis patients. *Sci. Immunol.* **6**, eabj1031 (2021).
13. A. Sattler, E. Schrezenmeier, U. A. Weber, A. Potekhin, F. Bachmann, H. Straub-Hohenbleicher, K. Budde, E. Storz, V. Proß, Y. Bergmann, L. M. Thole, C. Tizian, O. Hölsken, A. Diefenbach, H. Schrezenmeier, B. Jahrsdörfer, T. Zemojtel, K. Jechow, C. Conrad, S. Lukassen, D. Stauch, N. Lachmann, M. Choi, F. Halleck, K. Kotsch, Impaired humoral and cellular immunity after SARS-CoV2 BNT162b2 (Tozinameran) prime-boost vaccination in kidney transplant recipients. *J. Clin. Invest.* **131**, e150175 (2021).
14. I. Benotmane, G. Gautier-Vargas, N. Cognard, J. Olagne, F. Heibel, L. Braun-Parvez, J. Martzloff, P. Perrin, B. Moulin, S. Fafi-Kremer, S. Caillard, Low immunization rates among kidney transplant recipients who received 2 doses of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *Kidney Int.* **99**, 1498–1500 (2021).
15. S. Caillard, O. Thanaat, COVID-19 vaccination in kidney transplant recipients. *Nat. Rev. Nephrol.* **17**, 785–787 (2021).
16. S. Caillard, N. Chavarot, D. Bertrand, N. Kamar, O. Thanaat, V. Moal, C. Masset, M. Hazzan, P. Gatault, A. Sicard, J. M. Chemouny, J. P. Rerolle, C. Colosio, H. Francois, J. Bamoulid, N. Bouvier, A. Duveau, D. Anglicheau, G. Blanco; French Society of Transplantation, Occurrence of severe COVID-19 in vaccinated transplant patients. *Kidney Int.* **100**, 477–479 (2021).
17. N. M. Ali, N. Alnazari, S. A. Mehta, B. Boyarsky, R. K. Avery, D. L. Segev, R. A. Montgomery, Z. A. Stewart, Development of COVID-19 infection in transplant recipients after SARS-CoV-2 vaccination. *Transplantation* **105**, e104–e106 (2021).
18. P.-S. Heeger, C. P. Larsen, D. L. Segev, Implications of defective immune responses in SARS-CoV-2 vaccinated organ transplant recipients. *Sci. Immunol.* **6**, eabj6513 (2021).
19. C. H. Hansen, D. Michlmayr, S. M. Gubbels, K. Molbak, S. Ethelberg, Assessment of protection against reinfection with SARS-CoV-2 among 4 million PCR-tested individuals in Denmark in 2020: A population-level observational study. *Lancet* **397**, 1204–1212 (2021).
20. V. J. Hall, S. Foulkes, A. Charlett, A. Atti, E. J. M. Monk, R. Simmons, E. Wellington, M. J. Cole, A. Saei, B. Oguti, K. Munro, S. Wallace, P. D. Kirwan, M. Shrotri, A. Vusirikala, S. Rokadiya, M. Kall, M. Zambon, M. Ramsay, T. Brooks, C. S. Brown, M. A. Chand, S. Hopkins; SIREN Study Group, SARS-CoV-2 infection rates of antibody-positive compared with antibody-negative health-care workers in England: A large, multicentre, prospective cohort study (SIREN). *Lancet* **397**, 1459–1469 (2021).
21. S. F. Lumley, D. O'Donnell, N. E. Stoesser, P. C. Matthews, A. Howarth, S. B. Hatch, B. D. Marsden, S. Cox, T. James, F. Warren, L. J. Peck, T. G. Ritter, Z. de Toledo, L. Warren, D. Axten, R. J. Cornell, E. Y. Jones, D. I. Stuart, G. Screation, D. Ebner, S. Hoosdally, M. Chand, D. W. Crook, A.-M. O'Donnell, C. P. Conlon, K. B. Pouwels, A. S. Walker, T. E. A. Peto, S. Hopkins, T. M. Walker, K. Jeffery, D. W. Eyre, Antibody status and incidence of SARS-CoV-2 infection in health care workers. *N. Eng. J. Med.* **384**, 533–540 (2021).
22. L. J. Abu-Raddad, H. Chemaitelly, P. Coyle, J. A. Malek, A. A. Ahmed, Y. A. Mohamoud, S. Younus-kunju, H. H. Ayoub, Z. A. Kanaani, E. A. Kuwari, A. A. Butt, A. Jeremijenko, A. H. Kaleeckal, A. N. Latif, R. M. Shaik, H. F. A. Rahim, G. K. Nasrallah, H. M. Yassine, M. G. A. Kuwari, H. E. A. Romaihi, M. H. Al-Thani, A. A. Khal, R. Bertollini, SARS-CoV-2 antibody-positivity protects against reinfection for at least seven months with 95% efficacy. *EClinicalMedicine* **35**, 100861 (2021).
23. L. Couzi, M. Manook, S. Caillard, É. Épailly, B. Barrou, D. Anglicheau, M. Buchler, S. Musso, J. Dumortier, O. Thanaat, L. Sebbag, G. Blanco, Y. Le Meur, Y. A. Patel, M. Samoylova, L. McElroy, B. I. Shaw, S. Sanoff, M. Hazzan, Impact of Covid-19 on kidney transplant and waiting list patients: Lessons from the first wave of the pandemic. *Nephrol. Ther.* **17**, 245–251 (2021).
24. A. Favà, L. Donadeu, N. Sabé, V. Pernin, J. González-Costello, L. Lladó, M. Meneghini, X. Charmetant, E. García-Romero, A. Cacher, A. Torija, R. Rodríguez-Urquía, E. Crespo, I. Teubel, E. Mellili, N. Montero, A. Manonelles, R. Preyer, K. Strecker, A. Ovize, J. J. Lozano, J. Sidorova, J. M. Cruzado, M. Le Quintrec, O. Thanaat, O. Bestard, SARS-CoV-2-specific serological and functional T cell immune responses during acute and early COVID-19 convalescence in solid organ transplant patients. *Am. J. Transplant.* **21**, 2749–2761 (2021).
25. R. A. Seder, P. A. Darrah, M. Roederer, T-cell quality in memory and protection: Implications for vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 247–258 (2008).
26. R. Channappanavar, C. Fett, J. Zhao, D. K. Meyerholz, S. Perlman, Virus-specific memory CD8 T cells provide substantial protection from lethal severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J. Virol.* **88**, 11034–11044 (2014).
27. M. J. Bevan, Helping the CD8<sup>+</sup> T-cell response. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 595–602 (2004).
28. A. Grifoni, D. Weiskopf, S. I. Ramirez, J. Mateus, J. M. Dan, C. R. Moderbacher, S. A. Rawlings, A. Sutherland, L. Premkumar, R. S. Jodi, D. Marrama, A. M. de Silva, A. Frazier, A. F. Carlin, J. A. Greenbaum, B. Peters, F. Krammer, D. M. Smith, S. Crotty, A. Sette, Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell* **181**, 1489–1501.e15 (2020).
29. B. IsraeLOW, T. Mao, J. Klein, E. Song, B. Menasche, S. B. Omer, A. Iwasaki, Adaptive immune determinants of viral clearance and protection in mouse models of SARS-CoV-2. *Sci. Immunol.* **6**, eabl4509 (2021).
30. X. Chen, R. Li, Z. Pan, C. Qian, Y. Yang, R. You, J. Zhao, P. Liu, L. Gao, Z. Li, Q. Huang, L. Xu, J. Tang, Q. Tian, W. Yao, L. Hu, X. Yan, X. Zhou, Y. Wu, K. Deng, Z. Zhang, Z. Qian, Y. Chen, L. Ye, Human monoclonal antibodies block the binding of SARS-CoV-2 spike protein to angiotensin converting enzyme 2 receptor. *Cell. Mol. Immunol.* **17**, 647–649 (2020).
31. R. Shi, C. Shan, X. Duan, Z. Chen, P. Liu, J. Song, T. Song, X. Bi, C. Han, L. Wu, G. Gao, X. Hu, Y. Zhang, Z. Tong, W. Huang, W. J. Liu, G. Wu, B. Zhang, L. Wang, J. Qi, H. Feng, F.-S. Wang, Q. Wang, G. F. Gao, Z. Yuan, J. Yan, A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2. *Nature* **584**, 120–124 (2020).
32. Y. Wu, F. Wang, C. Shen, W. Peng, D. Li, C. Zhao, Z. Li, S. Li, Y. Bi, Y. Yang, Y. Gong, H. Xiao, Z. Fan, S. Tan, G. Wu, W. Tan, X. Lu, C. Fan, Q. Wang, Y. Liu, C. Zhang, J. Qi, G. F. Gao, F. Gao, L. Liu, A noncompeting pair of human neutralizing antibodies block COVID-19 virus binding to its receptor ACE2. *Science* **368**, 1274–1278 (2020).
33. E. Seydoux, L. J. Homad, A. J. MacCamy, K. R. Parks, N. K. Hurlburt, M. F. Jennewein, N. R. Akins, A. B. Stuart, Y.-H. Wan, J. Feng, R. E. Whaley, S. Singh, M. Boeckh, K. W. Cohen, M. J. McElrath, J. A. Englund, H. Y. Chu, M. N. Pancera, A. T. McGuire, L. Stamatatos, Analysis of a SARS-CoV-2-infected individual reveals development of potent neutralizing antibodies with limited somatic mutation. *Immunity* **53**, 98–105.e5 (2020).
34. B. Ju, Q. Zhang, J. Ge, R. Wang, J. Sun, X. Ge, J. Yu, S. Shan, B. Zhou, S. Song, X. Tang, J. Yu, J. Lan, J. Yuan, H. Wang, J. Zhao, S. Zhang, Y. Wang, X. Shi, L. Liu, J. Zhao, X. Wang, Z. Zhang, L. Zhang, Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Nature* **584**, 115–119 (2020).
35. M. Espi, J. Charmetant, T. Barba, L. Koppe, C. Pelletier, E. Kalbacher, E. Chalencon, V. Mathias, A. Ovize, E. Cart-Tanneur, C. Bouz, L. Pellegrina, E. Morelon, D. Fouque, L. Juillard, O. Thanaat, The ROMANOV study found impaired humoral and cellular immune responses to SARS-CoV-2 mRNA vaccine in virus unexposed patients receiving maintenance hemodialysis. *Kidney Int.* **100**, 928–936 (2021).
36. C.-C. Chen, A. Koenig, C. Saison, S. Dahdal, G. Rigault, T. Barba, M. Taillardet, D. Charatoire, M. Ovize, E. Morelon, T. Defrance, O. Thanaat, CD4<sup>+</sup> T cell help is mandatory for naive and memory donor-specific antibody responses: Impact of therapeutic immunosuppression. *Front. Immunol.* **9**, 275 (2018).
37. A. Lanzavecchia, Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* **314**, 537–539 (1985).
38. J. A. Roco, L. Mesin, S. C. Binder, C. Nefzger, P. Gonzalez-Figueroa, P. F. Canete, J. Ellyard, Q. Shen, P. A. Robert, J. Cappello, H. Vohra, Y. Zhang, C. R. Nowosad, A. C. Schiepers, L. M. Corcoran, K.-M. Toellner, J. M. Polo, M. Meyer-Hermann, G. D. Victoria, C. G. Vinuesa, Class-switch recombination occurs infrequently in germinal centers. *Immunity* **51**, 337–350.e7 (2019).
39. C. Gil-Cruz, S. Bobat, J. L. Marshall, R. A. Kingsley, E. A. Ross, I. R. Henderson, D. L. Leyton, R. E. Coughlan, M. Khan, K. T. Jensen, C. D. Buckley, G. Dougan, I. C. M. MacLennan, C. López-Macias, A. F. Cunningham, The porin OmpD from nontyphoidal *Salmonella* is a key target for a protective B1b cell antibody response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 9803–9808 (2009).
40. A. E. Schager, C. C. Dominguez-Medina, F. Necchi, F. Micoli, Y. S. Goh, M. Goodall, A. Flores-Langarica, S. Bobat, C. N. L. Cook, M. Arcuri, A. Marini, L. D. W. King, F. C. Morris, G. Anderson, K.-M. Toellner, I. R. Henderson, C. López-Macias, C. A. MacLennan, A. F. Cunningham, IgG responses to porins and lipopolysaccharide within an outer membrane-based vaccine against nontyphoidal *Salmonella* develop at discordant rates. *mBio* **9**, e02379–17 (2018).
41. J. H. Lam, F. L. Smith, N. Baumgarth, B cell activation and response regulation during viral infections. *Viral Immunol.* **33**, 294–306 (2020).
42. S. A. Jenks, K. S. Cashman, E. Zumaquero, U. M. Marigorta, A. V. Patel, X. Wang, D. Tomar, M. C. Woodruff, Z. Simon, R. Bugrovsky, E. L. Blalock, C. D. Scharer, C. M. Tipton, C. Wei, S. S. Lim, M. Petri, T. B. Niewold, J. H. Anolik, G. Gibson, F. E.-H. Lee, J. M. Boss, F. E. Lund, I. Sanz, Distinct effector B cells induced by unregulated toll-like receptor 7 contribute to pathogenic responses in systemic Lupus Erythematosus. *Immunity* **49**, 725–739.e6 (2018).
43. I. Sanz, C. Wei, S. A. Jenks, K. S. Cashman, C. Tipton, M. C. Woodruff, J. Hom, F. E.-H. Lee, Challenges and opportunities for consistent classification of human B cell and plasma cell populations. *Front. Immunol.* **10**, 2458 (2019).



44. S. Heidt, D. L. Roelen, C. Eijnsink, M. Eikmans, C. van Kooten, F. H. J. Claas, A. Mulder, Calcineurin inhibitors affect B cell antibody responses indirectly by interfering with T cell help. *Clin. Exp. Immunol.* **159**, 199–207 (2010).
45. R. Morita, N. Schmitt, S.-E. Benteibibel, R. Ranganathan, L. Bourdery, G. Zurawski, E. Foucat, M. Dullaers, S. Oh, N. Sabzghabaei, E. M. Lavecchio, M. Punaro, V. Pascual, J. Banchereau, H. Ueno, Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* **34**, 108–121 (2011).
46. J. S. Turner, J. A. O'Halloran, E. Kalaidina, W. Kim, A. J. Schmitz, J. Q. Zhou, T. Lei, M. Thapa, R. E. Chen, J. B. Case, F. Amanat, A. M. Rauseo, A. Haile, X. Xie, M. K. Kleibert, T. Suessen, W. D. Middleton, P.-Y. Shi, F. Krammer, S. A. Teefey, M. S. Diamond, R. M. Presti, A. H. Ellebedy, SARS-CoV-2 mRNA vaccines induce persistent human germinal centre responses. *Nature* **596**, 109–113 (2021).
47. B. J. Laidlaw, A. H. Ellebedy, The germinal centre B cell response to SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Immunol.* **22**, 7–18 (2022).
48. S. Feng, D. J. Phillips, T. White, H. Sayal, P. K. Aley, S. Bibi, C. Dold, M. Fuskova, S. C. Gilbert, I. Hirsch, H. E. Humphries, B. Jepson, E. J. Kelly, E. Plested, K. Shoemaker, K. M. Thomas, J. Vekemans, T. L. Villafana, T. Lambe, A. J. Pollard, M. Voysey; Oxford COVID Vaccine Trial Group, Correlates of protection against symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat. Med.* **27**, 2032–2040 (2021).
49. D. S. Khoury, D. Cromer, A. Reynaldi, T. E. Schlub, A. K. Wheatley, J. A. Juno, K. Subbarao, S. J. Kent, J. A. Triccas, M. P. Davenport, Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat. Med.* **27**, 1205–1211 (2021).
50. M. Bergwerk, T. Gonen, Y. Lustig, S. Amit, M. Lipsitch, C. Cohen, M. Mandelboim, E. G. Levin, C. Rubin, V. Indenbaum, I. Tal, M. Zavitan, N. Zuckerman, A. Bar-Chaim, Y. Kreiss, G. Regev-Yochay, Covid-19 breakthrough infections in vaccinated health care workers. *N. Eng. J. Med.* **385**, 1474–1484 (2021).
51. M. Miele, R. Busà, G. Russell, M. C. Sorrentino, M. Di Bella, F. Timoneri, A. Mularoni, G. Panarello, P. Vitulo, P. G. Conaldi, M. Bulati, Impaired anti-SARS-CoV-2 humoral and cellular immune response induced by Pfizer-BioNTech BNT162b2 mRNA vaccine in solid organ transplanted patients. *Am. J. Transplant.* **21**, 2919–2921 (2021).
52. M. C. Woodruff, R. P. Ramonell, D. C. Nguyen, K. S. Cashman, A. S. Saini, N. S. Haddad, A. M. Ley, S. Kyu, J. C. Howell, T. Ozturk, S. Lee, N. Suryadevara, J. B. Case, R. Bugrovsky, W. Chen, J. Estrada, A. Morrison-Porter, A. Derrico, F. A. Anam, M. Sharma, H. M. Wu, S. N. Le, S. A. Jenks, C. M. Tipton, B. Staitieh, J. L. Daiss, E. Ghosn, M. S. Diamond, R. H. Carnahan, J. E. Crowe, W. T. Hu, F. E.-H. Lee, I. Sanz, Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nat. Immunol.* **21**, 1506–1516 (2020).
53. S. A. Apostolidis, M. Kakara, M. M. Painter, R. R. Goel, D. Mathew, K. Lenzi, A. Rezk, K. R. Patterson, D. A. Espinoza, J. C. Kadri, D. M. Markowitz, C. E. Markowitz, I. Mexhitaj, D. Jacobs, A. Babb, M. R. Betts, E. T. L. Prak, D. Weiskopf, A. Grifoni, K. A. Lundgreen, S. Gouma, A. Sette, P. Bates, S. E. Hensley, A. R. Greenplate, E. J. Wherry, R. Li, A. Bar-Or, Cellular and humoral immune responses following SARS-CoV-2 mRNA vaccination in patients with multiple sclerosis on anti-CD20 therapy. *Nat. Med.* **27**, 1990–2001 (2021).
54. K. Lederer, E. Bettini, K. Parvathaneni, M. M. Painter, D. Agarwal, K. A. Lundgreen, M. Weirick, K. Muralidharan, D. Castano, R. R. Goel, X. Xu, E. M. Drapeau, S. Gouma, J. T. Ort, M. Awofolaju, A. R. Greenplate, C. Le Coz, N. Romberg, J. Trofe-Clark, G. Malat, L. Jones, M. Rosen, D. Weiskopf, A. Sette, B. Besharatian, M. Kaminiski, S. E. Hensley, P. Bates, E. J. Wherry, A. Naji, V. Bhoj, M. Locci, Germinal center responses to SARS-CoV-2 mRNA vaccines in healthy and immunocompromised individuals. *Cell* **185**, 1–17 (2022).
55. J. A. Juno, H.-X. Tan, W. S. Lee, A. Gherardin, H. G. Kelly, K. Wragg, R. Esterbauer, H. E. Kent, C. J. Batten, F. L. Mordant, N. A. Gherardin, P. Pymm, M. H. Dietrich, N. E. Scott, W.-H. Tham, D. I. Godfrey, K. Subbarao, M. P. Davenport, S. J. Kent, A. K. Wheatley, Humoral and circulating follicular helper T cell responses in recovered patients with COVID-19. *Nat. Med.* **26**, 1428–1434 (2020).
56. O. Thunat, A. Koenig, C. Leibler, P. Grimbert, Effect of immunosuppressive drugs on humoral allo sensitization after kidney transplant. *J. Am. Soc. Nephrol.* **27**, 1890–1900 (2016).
57. A. C. Allison, E. M. Eugui, Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. *Immunol. Rev.* **136**, 5–28 (1993).
58. K. G. Smith, N. M. Isabel, M. G. Catton, J. A. Leydon, G. J. Becker, R. G. Walker, Suppression of the humoral immune response by mycophenolate mofetil. *Nephrol. Dial. Transplant.* **13**, 160–164 (1998).
59. G. H. Struijk, R. C. Minnee, S. D. Koch, A. H. Zwinderman, K. A. M. I. van Donselaar-van der Pant, M. M. Idu, I. J. M. ten Berge, F. J. Bemelman, Maintenance immunosuppressive therapy with everolimus preserves humoral immune responses. *Kidney Int.* **78**, 934–940 (2010).
60. R. S. Gaston, J. M. Cecka, B. L. Kasiske, A. M. Fieberg, R. Leduc, F. C. Cosio, S. Gourishankar, J. Grande, P. Halloran, L. Hunsicker, R. Mannon, D. Rush, A. J. Matas, Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. *Transplantation* **90**, 68–74 (2010).
61. E. Pouliquen, A. Koenig, C. C. Chen, A. Sicard, M. Rabeyrin, E. Morelon, V. Dubois, O. Thunat, Recent advances in renal transplantation: Antibody-mediated rejection takes center stage. *F1000Prime Rep.* **7**, 51 (2015).
62. O. Thunat, Humoral immunity in chronic allograft rejection: Puzzle pieces come together. *Transpl. Immunol.* **26**, 101–106 (2012).
63. N. Kamar, F. Abravanel, O. Marion, C. Couat, J. Izopet, A. Del Bello, Three doses of an mRNA Covid-19 vaccine in solid-organ transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* **385**, 661–662 (2021).
64. W. A. Werbel, B. J. Boyarsky, M. T. Ou, A. B. Massie, A. A. R. Tobian, J. M. Garonzik-Wang, D. L. Segev, Safety and immunogenicity of a third dose of SARS-CoV-2 vaccine in solid organ transplant recipients: A case series. *Ann. Intern. Med.* **174**, 1330–1332 (2021).
65. I. Benotmane, G. Gautier, P. Perrin, J. Olagne, N. Cognard, S. Fafi-Kremer, S. Caillard, Antibody response after a third dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant recipients with minimal serologic response to 2 doses. *JAMA* **326**, 1063 (2021).
66. V. G. Hall, V. H. Ferreira, T. Ku, M. Ierullo, B. Majchrzak-Kita, C. Chaparro, N. Selzner, J. Schiff, M. McDonald, G. Tomlinson, V. Kulasingam, D. Kumar, A. Humar, Randomized trial of a third dose of mRNA-1273 vaccine in transplant recipients. *N. Eng. J. Med.* **385**, 1244–1246 (2021).
67. S. Caillard, O. Thunat, I. Benotmane, C. Masset, G. Blancho, Antibody response to a fourth messenger RNA COVID-19 vaccine dose in kidney transplant recipients: A case series. *Ann. Intern. Med.* (2022).
68. Y. Natori, M. Shiotsuka, J. Slomovic, K. Hoschler, V. Ferreira, P. Ashton, C. Rotstein, L. Lilly, J. Schiff, L. Singer, A. Humar, D. Kumar, A double-blind, randomized trial of high-dose vs standard-dose influenza vaccine in adult solid-organ transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* **66**, 1698–1704 (2018).
69. M. Mombelli, N. Rettby, M. Perreau, M. Pascual, G. Pantaleo, O. Manuel, Immunogenicity and safety of double versus standard dose of the seasonal influenza vaccine in solid-organ transplant recipients: A randomized controlled trial. *Vaccine* **36**, 6163–6169 (2018).
70. D. Steensels, N. Pierlet, J. Penders, D. Mesotten, L. Heylen, Comparison of SARS-CoV-2 antibody response following vaccination with BNT162b2 and mRNA-1273. *JAMA* **326**, 1533–1535 (2021).
71. M. P. O'Brien, E. Forleo-Neto, B. J. Musser, F. Isa, K.-C. Chan, N. Sarkar, K. J. Bar, R. V. Barnabas, D. H. Barouch, M. S. Cohen, C. B. Hurt, D. R. Burwen, M. A. Marovich, P. Hou, I. Heirman, J. D. Davis, K. C. Turner, D. Ramesh, A. Mahmood, A. T. Hooper, J. D. Hamilton, Y. Kim, L. A. Purcell, A. Baum, C. A. Kyrtatsous, J. Krainson, R. Perez-Perez, R. Mohseni, B. Kowal, A. T. DiCioccio, N. Stahl, L. Lipsich, N. Braunstein, G. Herman, G. D. Yancopoulos, D. M. Weinreich; Covid-19 Phase 3 Prevention Trial Team, Subcutaneous REGEN-COV antibody combination to prevent Covid-19. *N. Eng. J. Med.* **385**, 1184–1195 (2021).
72. L. R. Baden, H. M. El Sahly, B. Essink, K. Kotloff, S. Frey, R. Novak, D. Diemert, S. A. Spector, N. Roupchal, C. B. Creech, J. McGittigan, S. Khetan, N. Segall, J. Solis, A. Brosz, C. Fierro, H. Schwartz, K. Neuzil, L. Corey, P. Gilbert, H. Janes, D. Follmann, M. Marovich, J. Mascola, L. Polakowski, J. Ledgerwood, B. S. Graham, H. Bennett, R. Pajon, C. Knightly, B. Leav, W. Deng, H. Zhou, S. Han, M. Ivarsson, J. Miller, T. Zaks; COVE Study Group, Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N. Eng. J. Med.* **384**, 403–416 (2021).
73. G. Mattiuzzo, E. M. Bentley, M. Hassall, S. Routley, V. Bernasconi, P. Kristiansen, H. Harvala, D. Roberts, G. Semple, L. C. Turtle, P. J. Openshaw, K. Baillie, C. Investigators, L. S. H. Nissen-Meyer, A. B. Brants, E. Atkinson, P. Rigby, D. Padley, N. Almond, N. J. Rose, M. Page, *Establishment of the WHO International Standard and Reference Panel for Anti-SARS-CoV-2 Antibody* (World Health Organization, 2020).
74. H. Wang, D. Wirejia, L. Yang, P. L. Bulterys, C. Costales, K. Röltgen, J. Manalac, J. Yee, J. Zehnder, R. Z. Shi, S. D. Boyd, B. A. Pinsky, Case-control study of individuals with discrepant nucleocapsid and spike protein SARS-CoV-2 IgG results. *Clin. Chem.* **67**, 977–986 (2021).
75. B. Pozzetto, V. Legros, S. Djebali, V. Barateau, N. Guibert, M. Villard, L. Peyrot, O. Allatif, J.-B. Fassier, A. Massardier-Pilonchéry, K. Brengel-Pesce, M. Yaugel-Novoa, S. Denolly, B. Boson, T. Bourlet, A. Bal, M. Valette, T. Andrieu, B. Lina, F.-L. Cosset, S. Paul, T. Defrance, J. Marvel, T. Walzer, S. Trouillet-Assant, Immunogenicity and efficacy of heterologous ChadOx1–BNT162b2 vaccination. *Nature* **600**, 701–706 (2021).

**Acknowledgments:** We thank A. Kochman and the members of the Groupe de Recherche Clinique (GREC: C. Dagot, F. Pauwels, F. M'Raiagh, and D. Sperandio) for excellent technical assistance during the collection of the samples. O.T. is thankful to L. Siard, C. Lecuelle, and P. Favre from Eurofins Biomnis for their help during the conduction of the study. **Funding:** The study was supported by funding from the Société Francophone de Transplantation (to X.C.), the Hospices civils de Lyon (to M.E.), INSERM (to M.E. and S.F.-K.), the Etablissement Français du Sang (to O.T.), the Fondation pour la Recherche Médicale (PME20180639518 to O.T.), the Strasbourg University Hospital (SeroCoV-HUS; PRI 7782 to S.F.-K.), Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC N 2017-HUS no. 6997 to S.F.-K.), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-18-CE17-0028 to S.F.-K.), and the Laboratoire d'Excellence TRANSLANTEX (ANR-11-LABX-0070\_TRANSPLANTEX to S.F.-K.). **Author contributions:** X.C., M.E., and O.T. conceptualized and designed experiments. X.C., M.E., I.B., F.H., F.B., G.G.-V., M.D., P.P., A.K., N.C.,



C.L., L.M., E.M., S.C., and O.T. acquired the clinical samples. X.C., M.E., I.B., V.B., F.G., P.R., E.S., F.P., and A.O. performed the experiments (X.C. and M.E.: T cell response; I.B., F.G., P.R., E.S., and F.P.: neutralization and anti-nucleocapsid IgG assays; V.B.: B cell response; A.O.: anti-RBD IgG assay). X.C., M.E., I.B., A.O., S.F.-K., S.C., and O.T. analyzed the data. X.C. and O.T. wrote the original draft. X.C., F.H., F.B., G.G.-V., M.D., P.P., A.K., N.C., C.L., F.G., L.M., P.R., E.M., T.D., S.F.-K., S.C., and O.T. reviewed and edited the manuscript. **Competing interests:** O.T. participated in advisory boards for Biotech, Novartis, and AstraZeneca and received research grants from Immucor, Biomerieux, and BMS. All other authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** All data associated with this study are present in the paper or the Supplementary Materials. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) license, which permits unrestricted use, distribution, and

reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. This license does not apply to figures/photos/artwork or other content included in the article that is credited to a third party; obtain authorization from the rights holder before using this material.

Submitted 25 July 2021  
Resubmitted 15 November 2021  
Accepted 25 January 2022  
Published First Release 1 February 2022  
Published 16 March 2022  
10.1126/scitranslmed.abl6141

## Infection or a third dose of mRNA vaccine elicits neutralizing antibody responses against SARS-CoV-2 in kidney transplant recipients

Xavier CharmetantMaxime Espillies BenotmaneVéronique BarateauFrancoise HeibelFanny BuronGabriela Gautier-VargasMarion DelafossePeggy PerrinAlice KoenigNoëlle CognardCharlène LeviFloriane GallaisLouis ManièrePaola RossolilloEric SoulierFlorian PierreAnne OvizeEmmanuel MorelonThierry DefranceSamira Fafi-KremerSophie CaillardOlivier Thauinat

*Sci. Transl. Med.*, 14 (636), eabl6141. • DOI: 10.1126/scitranslmed.abl6141

### Protecting transplant recipients

Recipients of kidney transplants are placed on immunosuppressive drugs, which, while prevent rejection of their graft, also put them at increased risk of infections with viruses such as SARS-CoV-2. Here, the authors compared the immune response elicited by SARS-CoV-2 infection and vaccination in kidney transplant recipients. Infection elicited a broader response to SARS-CoV-2 associated with fewer cases of reinfection. The authors also observed a subset of individuals that did not respond to two doses of mRNA vaccine, potentially due to exposure to the immunosuppressive drug, mycophenolate mofetil. A subset of nonresponders who received a third dose of mRNA vaccine developed antibodies comparable to responders to two doses, suggesting that populations with immunosuppression should be prioritized for booster vaccine doses.

### View the article online

<https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.abl6141>

### Permissions

<https://www.science.org/help/reprints-and-permissions>

Use of this article is subject to the [Terms of service](#)

## OBSERVATIONS: CASE REPORTS

## Antibody Response to a Fourth Messenger RNA COVID-19 Vaccine Dose in Kidney Transplant Recipients: A Case Series

**Background:** Kidney transplant recipients receiving immunosuppressive drugs have impaired immune responses to messenger RNA (mRNA) COVID-19 vaccines (1). Consequently, despite standard vaccination with mRNA vaccines, many of these patients remain at high risk for severe disease during the ongoing pandemic. The U.S. Food and Drug Administration has authorized immunocompromised people to receive a third dose of mRNA vaccine after the standard 2-dose regimen to further boost protection, and French health authorities approved a third dose on 11 April 2021. Subsequent studies found that approximately 50% of patients who did not respond after a second dose seroconverted after a third dose, which produced an overall seroconversion rate of about 65% (2, 3). Antispike IgG titers above 143 binding antibody units (BAU) per milliliter correlate with the presence of neutralizing antibodies (the most widely accepted marker of disease protection) against the wild-type virus and the Alpha, Beta, and Gamma variants, but neutralization of the Delta variant requires higher antispike IgG titers (4). Therefore, patients with low titers of antispike IgG may remain insufficiently protected. In June 2021, French health authorities approved offering a fourth vaccine dose to recipients of solid organ transplants who had a weak response after a third dose.

**Objective:** To investigate whether a fourth dose of an mRNA-based anti-SARS-CoV-2 vaccine would increase antispike

IgG titers in kidney transplant recipients who showed a weak serologic response after 3 doses.

**Case Report:** A fourth dose of mRNA vaccine (BNT162b2 [Pfizer],  $n = 34$ ; mRNA-1273 [Moderna],  $n = 58$ ) was given to 92 kidney transplant recipients from 3 independent French university hospitals (Strasbourg, Lyon, and Nantes) who had antispike IgG titers less than 143 BAU/mL 1 month after a third dose. All had measurements of antispike IgG titers 2 to 6 weeks later (median, 29 days [interquartile range, 26 to 34 days]). The Table shows the characteristics of these patients.

There were no safety concerns with the fourth vaccine dose. After a median of 29 days, median antispike IgG levels increased from 16.4 BAU/mL (interquartile range, 5.9 to 62.3 BAU/mL) to 145 BAU/mL (interquartile range, 27.6 to 243 BAU/mL) (Figure) and 50% of patients reached the threshold of 143 BAU/mL. Patients who reached this threshold had a longer interval between their transplant and fourth vaccine dose and were less frequently treated with steroids (Table). The percentage of patients who had antispike IgG titers above 143 BAU/mL after the fourth dose was 48% for the BNT162b2 vaccine and 52% for the mRNA-1273 vaccine, and patients who received the mRNA-1273 vaccine had higher IgG titers (median, 150 vs. 122 BAU/mL). Only 1 patient was subsequently diagnosed with mild COVID-19, and he had an antispike IgG level of 28 BAU/mL 1 month after his fourth vaccine dose.

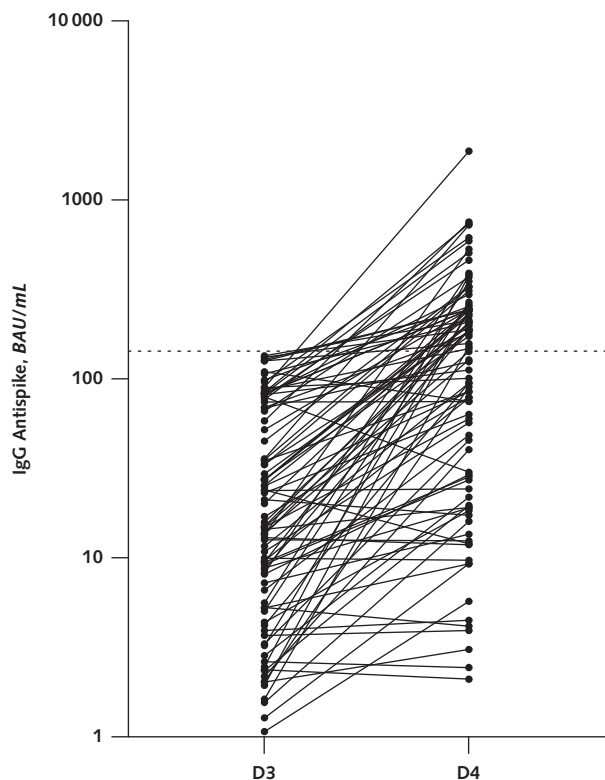
**Discussion:** Our study indicates that a fourth dose of an mRNA-based vaccine produces a satisfactory antibody response in some kidney transplant recipients who did not respond adequately after 3 previous doses, and it supports the

**Table.** Characteristics of 92 Kidney Transplant Recipients Who Received a Fourth Dose of mRNA Vaccine Against SARS-CoV-2, According to Their Subsequent Levels of IgG Antibody Against the Spike Protein

Characteristic	Entire Cohort ( $n = 92$ )	IgG >143 BAU/mL After 4 Doses ( $n = 46$ )	IgG <143 BAU/mL After 4 Doses ( $n = 46$ )
Median age (IQR), $y$	55.9 (47.1–64.2)	57.5 (49.9–64.6)	53 (45.6–61.9)
Male sex, $n$ (%)	64 (69.5)	35 (76)	29 (63)
Median BMI (IQR), $kg/m^2$	26.3 (22.8–30.2)	26.6 (22.2–29.1)	25.3 (22.8–30.6)
Comorbid conditions, $n$ (%)			
Cardiovascular disease	28 (30.4)	13 (28.3)	15 (32.6)
Diabetes	30 (32.6)	16 (34.8)	14 (30.4)
Hypertension	76 (82.6)	37 (80.3)	38 (82.6)
History of cancer	20 (21.7)	9 (19.6)	11 (23.6)
Median time from kidney transplant (IQR), $y$	5.5 (2.3–11.4)	7.2 (3–11.7)	4.5 (1.6–11.1)
First transplant, $n$ (%)	79 (85.8)	37 (80.4)	42 (91.4)
Deceased donor, $n$ (%)	77 (83.6)	37 (80.4)	40 (86.9)
Medication use, $n$ (%)			
Calcineurin inhibitors			
Tacrolimus	70 (76)	32 (69.6)	38 (82.6)
Cyclosporine	17 (18.5)	11 (23.9)	6 (13)
None	5 (5.4)	3 (6.5)	2 (4.3)
MMF/MPA	74 (80.4)	36 (78.3)	38 (82.6)
mTOR inhibitors	16 (17.4)	9 (19.6)	7 (15.2)
Steroids	59 (64.1)	23 (50)	36 (78.3)
Median serum creatinine level (IQR)			
$\mu mol/L$	132 (113.3–162.7)	136.2 (121.9–164.5)	131.5 (100.7–159.3)
$mg/dL$	1.49 (1.28–1.84)	1.54 (1.38–1.86)	1.49 (1.14–1.80)
Type of vaccine, $n$			
mRNA-1273 (Moderna)	58	30	28
BNT162b2 (Pfizer)	34	16	18
Median delay between third and fourth vaccine dose (IQR), $d$	68 (61–74.7)	68 (63–76)	63 (56.7–73.2)
Median antispike IgG titer after the third dose (IQR), BAU/mL	16.4 (5.9–62.3)	35.6 (14.7–83.3)	9.5 (3.6–21.7)

BAU = binding antibody units; BMI = body mass index; IQR = interquartile range; MMF = mycophenolate mofetil; MPA = mycophenolic acid; mRNA = messenger RNA; mTOR = mammalian target of rapamycin.

**Figure.** Antispike IgG titers measured 2–6 wk after the third and fourth vaccine doses in 92 kidney transplant recipients.



Titers are expressed in BAU after calibration to the World Health Organization standard. The dotted line indicates the threshold of 143 BAU/mL. BAU = binding antibody units; D3 = third dose; D4 = fourth dose.

use of a fourth vaccine dose for these patients. We have shown in an unpublished study that kidney transplant recipients with previous COVID-19 had higher antispike IgG titers than uninfected recipients who were vaccinated. Assuming that the difference can be attributed to a higher antigen dose with infection than with vaccination, those results also support the use of additional, repeated doses of vaccine for kidney transplant recipients who do not respond adequately to standard vaccination. Prophylactic infusion of monoclonal anti-SARS-CoV-2 antibodies can be offered to patients who do not respond adequately to additional vaccine doses (5). For example, in our experience, only 10% of patients who did not respond (<1 BAU/mL) after the third dose were able to reach antispike IgG titers above 143 BAU/mL after a fourth dose. It would have been interesting to examine T-cell immunity after repeated vaccine doses in these patients, but the assays are time-consuming, which makes it challenging to implement them during routine practice. Finally, we recognize that an increase in antispike IgG titers does not invariably provide protection from

infection and disease, which is why we encourage longitudinal studies with a sufficient duration of follow-up to evaluate the risk for COVID-19 in patients like these after additional vaccine doses.

*Sophie Caillard, MD, PhD*

Department of Nephrology and Transplantation, University Hospitals of Strasbourg, INSERM Unit 1109, Strasbourg, France

*Olivier Thauvat, MD, PhD*

Department of Transplantation Nephrology and Clinical Immunology, Hospices Civils de Lyon, Claude Bernard Lyon 1 University, INSERM Unit 1111, Lyon, France

*Ilies Benotmane, MD*

Department of Nephrology and Transplantation, University Hospitals of Strasbourg, INSERM Unit 1109, Strasbourg, France

*Christophe Masset, MD*

*Gilles Blancho, MD, PhD*

Institut de Transplantation Urologie Néphrologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, UMR 1064, INSERM, Nantes Université, Nantes, France

**Disclosures:** Disclosures can be viewed at [www.acponline.org/authors/icmje/ConflictOfInterestForms.do?msNum=L21-0598](http://www.acponline.org/authors/icmje/ConflictOfInterestForms.do?msNum=L21-0598).

**Corresponding Author:** Sophie Caillard, MD, PhD, Department of Nephrology and Transplantation, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 1, place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg, France; e-mail, [Sophie.caillard@chru-strasbourg.fr](mailto:Sophie.caillard@chru-strasbourg.fr).

doi:10.7326/L21-0598

## References

- Boyarisky BJ, Werbel WA, Avery RK, et al. Antibody response to 2-dose SARS-CoV-2 mRNA vaccine series in solid organ transplant recipients. *JAMA*. 2021;325:2204-2206. [PMID: 33950155] doi:10.1001/jama.2021.7489
- Benotmane I, Gautier G, Perrin P, et al. Antibody response after a third dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant recipients with minimal serologic response to 2 doses. *JAMA*. 2021. [PMID: 34297036] doi:10.1001/jama.2021.12339
- Kamar N, Abravanel F, Marion O, et al. Three doses of an mRNA Covid-19 vaccine in solid-organ transplant recipients [Letter]. *N Engl J Med*. 2021;385:661-662. [PMID: 34161700] doi:10.1056/NEJMc2108861
- Planas D, Veyer D, Baidaliuk A, et al. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature*. 2021;596:276-280. [PMID: 34237773] doi:10.1038/s41586-021-03777-9
- O'Brien MP, Forleo-Neto E, Musser BJ, et al; Covid-19 Phase 3 Prevention Trial Team. Subcutaneous REGEN-COV antibody combination to prevent Covid-19. *N Engl J Med*. 2021;385:1184-1195. [PMID: 34347950] doi:10.1056/NEJMoa2109682

## BRIEF COMMUNICATION

# Breakthrough COVID-19 cases despite prophylaxis with 150 mg of tixagevimab and 150 mg of cilgavimab in kidney transplant recipients

Ilies Benotmane<sup>1,2</sup>  | Aurélie Velay<sup>2,3</sup> | Gabriela Gautier-Vargas<sup>1</sup>  | Jérôme Olgne<sup>1</sup>  | Augustin Obrecht<sup>1</sup> | Noëlle Cognard<sup>1</sup>  | Françoise Heibel<sup>1</sup> | Laura Braun-Parvez<sup>1</sup> | Nicolas Keller<sup>1</sup> | Jonas Martzloff<sup>1</sup> | Peggy Perrin<sup>1</sup> | Romain Pszczolinski<sup>1</sup> | Bruno Moulin<sup>1,2</sup> | Samira Fafi-Kremer<sup>2,3</sup>  | Olivier Thauant<sup>4</sup>  | Sophie Caillard<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>Department of Nephrology, Dialysis and Transplantation, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

<sup>2</sup>Inserm UMR S1109 Labex Transplantex, Fédération de Médecine Translationnelle, Strasbourg University, Strasbourg, France

<sup>3</sup>Department of Virology, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

<sup>4</sup>Department of Transplantation, Nephrology and Clinical Immunology, Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France

## Correspondence

Ilies Benotmane, Department of Nephrology, Dialysis and Transplantation, Strasbourg University Hospital, 1 place de l'hôpital, Strasbourg 67091, France.  
Email: [ilies.benotmane@chru-strasbourg.fr](mailto:ilies.benotmane@chru-strasbourg.fr)

## Abstract

The cilgavimab–tixagevimab combination retains a partial in vitro neutralizing activity against the current SARS-CoV-2 variants of concern (omicron BA.1, BA.1.1, and BA.2). Here, we examined whether preexposure prophylaxis with cilgavimab–tixagevimab can effectively protect kidney transplant recipients (KTRs) against the omicron variant. Of the 416 KTRs who received intramuscular prophylactic injections of 150 mg tixagevimab and 150 mg cilgavimab, 39 (9.4%) developed COVID-19. With the exception of one case, all patients were symptomatic. Hospitalization and admission to an intensive care unit were required for 14 (35.9%) and three patients (7.7%), respectively. Two KTRs died of COVID-19-related acute respiratory distress syndrome. SARS-CoV-2 sequencing was carried out in 15 cases (BA.1,  $n = 5$ ; BA.1.1,  $n = 9$ ; BA.2,  $n = 1$ ). Viral neutralizing activity of the serum against the BA.1 variant was negative in the 12 tested patients, suggesting that this prophylactic strategy does not provide sufficient protection against this variant of concern. In summary, preexposure prophylaxis with cilgavimab–tixagevimab at the dose of 150 mg of each antibody does not adequately protect KTRs against omicron. Further clarification of the optimal dosing can assist in our understanding of how best to harness its protective potential.

## KEYWORDS

clinical research/practice, infection and infectious agents—viral, infection and infectious agents—viral: SARS-CoV-2/COVID-19, infectious disease, solid organ transplantation

## 1 | INTRODUCTION

Transplant recipients are at high risk of COVID-19-related death.<sup>1</sup> Currently, the serum SARS-CoV-2 neutralizing capacity

is considered the most reliable correlate of protection in this vulnerable population.<sup>2</sup> However, due to therapeutic immunosuppression, a significant fraction of transplant recipients fail to mount a protective antibody response despite reinforced

**Abbreviations:** BAU, binding arbitrary units; COVID-19, coronavirus disease 2019; FDA, Food and Drug Administration; KTRs, kidney transplant recipients; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

© 2022 The American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.

**TABLE 1** General characteristics of kidney transplant recipients ( $n = 39$ ) who developed COVID-19 after preexposure prophylaxis with tixagevimab and cilgavimab

Patient #	Sex	Age (y)	Time elapsed from KT (y)	eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	Cardiovascular disease	Diabetes	Hypertension	BMI	History of rejection	CNI	MMF/MPA	Steroids	imTOR	Belatacept	Rituximab
2	M	72.3	1.1	33	0	0	1	27.4	0	0	1	1	0	1	0
3	F	60.1	4.6	35	0	1	1	19	1	TAC	1	0	0	0	0
35	M	57.5	0.19	71	0	0	1	26.5	0	TAC	1	1	0	0	0
7	M	60.2	1.5	50	0	1	1	27.1	0	TAC	1	1	0	0	0
34	F	56.2	13.3	45	0	0	1	29.1	0	CSA	1	0	0	0	0
13	M	73.4	0.24	35	1	0	1	29	0	TAC	1	1	0	0	0
30	F	71.6	1.1	24	0	0	1	29.6	0	0	1	1	0	1	0
33	M	79.6	1.4	19	1	0	1	24.1	0	TAC	0	1	0	0	0
36	M	75.4	7.4	28	1	1	1	24.3	0	TAC	1	1	0	0	0
18	M	74.6	4.4	36	1	0	0	24.9	1	0	1	1	0	1	0
21	M	62.0	10.6	60	1	1	0	31.3	0	TAC	1	1	0	0	0
22	M	67.9	2.6	26	1	1	1	21.7	0	0	1	1	0	1	0
23	M	68.9	2	14	1	1	1	34.1	0	CSA	0	1	0	0	0
24	F	74.3	8.7	18	1	0	1	29.2	1	CSA	1	1	0	0	0
1	M	48.46	0.1	51	0	1	1	30.7	0	TAC	1	1	0	0	0
4	F	23.3	1.6	98	1	1	1	20	0	TAC	1	1	0	0	0
5	M	56.0	4.8	66	0	1	1	29.6	0	CSA	1	0	0	0	0
6	F	77.6	12.9	59	0	1	1	27.4	0	TAC	1	1	0	0	0
8	F	38.5	18.2	31	0	0	0	22	1	TAC	1	1	0	0	0
9	M	29.5	7.3	60	0	0	1	20.4	1	0	1	1	0	1	0
10	M	51.9	3.17	59	0	0	1	17.6	1	TAC	1	1	0	0	0
11	F	72.8	3.2	56	0	0	1	19.2	0	TAC	1	1	0	0	0
12	M	63.4	1.1	33	1	0	1	30.3	1	0	1	1	0	1	0
14	M	38.7	32.9	49	0	0	0	24.6	1	TAC	1	1	0	0	0
27	M	61.3	3.8	58	0	0	0	22.5	0	TAC	1	1	0	0	0
28	F	70.0	1.6	25	0	0	1	26.1	1	TAC	1	1	0	0	0
29	F	57.7	4.7	46	0	1	1	31.9	1	TAC	1	1	0	0	0
31	M	51.3	2.2	46	1	0	1	32	0	0	1	1	0	1	0
32	F	72.4	1.5	37	0	0	1	18	0	TAC	1	0	0	0	0
38	F	51.3	14	61	1	1	1	32.5	1	TAC	1	1	0	0	0
39	M	63.9	16.5	50	0	0	1	33.5	0	TAC	1	1	0	0	0
15	F	79.8	1.1	82	0	0	1	31.6	0	TAC	1	1	0	0	0
16	M	52.8	4.3	56	1	0	1	22.8	0	TAC	1	1	0	0	0
19	M	56.0	4.6	36	1	1	1	26.4	0	CSA	1	1	0	0	0
20	M	49.0	2.3	24	0	1	1	38.4	1	0	1	1	0	1	0
37	F	56.2	1.5	55	1	1	1	28.2	1	TAC	1	1	0	0	0
25	M	56.0	2.9	31	0	1	1	28.39	0	TAC	1	1	0	0	0
26	F	53.5	2.6	44	0	0	1	20.9	0	TAC	1	1	0	0	0
17	F	19.7	2.3	87	0	0	1	29	0	TAC	1	1	0	0	0

Note: Orange background: hospitalized patients; yellow background: symptomatic patients managed out of hospital; white background: asymptomatic patient.

Abbreviations: BMI, body mass index; CNI, calcineurin inhibitor; CSA, cyclosporine; d, days; eGFR, estimated glomerular filtration rate; F, female; HA, hospital admission; ICU, intensive care unit; KT, kidney transplantation; M, male; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; mTOR, mammalian target of rapamycin; NA, not available; TAC, tacrolimus; y, years.

\*Patients who did not receive casirivimab–imdevimab prior to cilgavimab–tixagevimab; \*\*Patients who received casirivimab–imdevimab prior to cilgavimab–tixagevimab (uninterpretable anti-RBD IgG levels).

T depleting therapy	Number of vaccine doses	Time from casirivimab–imdevimab injection to cilgavimab–tixagevimab injection (d)	Time from last dose vaccine injection to COVID-19 (d)	Time from cilgavimab–tixagevimab injection to COVID-19(d)	Upper respiratory symptoms	Fever, headache, myalgia, chills	Lower respiratory symptoms	HA	ICU	Death	Variant	IgG RBD (BAU/mL)	Neutralizing capacity against Omicron BA.1
0	3	28	160	16	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	BA1.1		
NA	3	138	263	5	Yes	No	No	Yes	No	No			
1	4	*	162	57	Yes	No	Yes	Yes	No	No		2771**	Negative
0	4	71	214	35	No	Yes	Yes	Yes	No	No			
0	2	*	229	62	Yes	Yes	No	Yes	No	No		522	
0	3	*	141	30	No	Yes	No	Yes	No	No		1775	Negative
0	3	28	222	28	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	BA.1	5128**	
0	3	28	273	16	Yes	Yes	No	Yes	No	No			
0	3	51	252	32	No	Yes	Yes	Yes	No	No	BA1.1	2785	
0	3	26	306	42	Yes	Yes	No	Yes	No	No	BA1.1	9442**	Negative
1	3	41	152	26	Yes	No	No	Yes	Yes	No	BA.1		
1	2	28	280	12	Yes	Yes	No	Yes	No	No	BA1.1		
0	2	51	351	36	No	Yes	Yes	Yes	No	No	BA.1	4241**	Negative
1	3	62	190	22	No	Yes	Yes	Yes	No	No	BA.1	3786**	Negative
0	2	*	327	5	No	Yes	Yes	No	No	No	BA1.1	2458	Negative
0	3	57	276	10	No	Yes	Yes	No	No	No	BA1.1	10932**	Negative
1	3	84	265	18	Yes	Yes	No	No	No	No			
1	3	*	257	5	No	Yes	No	No	No	No	BA1.1	1790	Negative
1	4	51	207	9	Yes	Yes	No	No	No	No			
1	3	33	228	12	Yes	No	No	No	No	No			
1	3	23	291	37	Yes	Yes	No	No	No	No		6800**	Negative
0	3	108	265	36	Yes	No	No	No	No	No	BA.1	5686**	Negative
0	3	63	201	12	Yes	No	No	No	No	No			
NA	4	*	167	21	Yes	Yes	No	No	No	No		3420	Negative
0	4	*	49	5	Yes	Yes	No	No	No	No			
0	3	*	225	6	Yes	Yes	No	No	No	No			
1	3	28	243	12	Yes	Yes	No	No	No	No			
1	3	*	321	40	No	Yes	No	No	No	No		1581	
1	3	31	211	1	Yes	Yes	No	No	No	No		3570**	
1	3	*	302	22	Yes	No	No	No	No	No			
1	3	*	314	47	Yes	No	No	No	No	No			
1	3	*	93	9	Yes	Yes	No	No	No	No			
1	3	69	295	32	Yes	Yes	No	No	No	No	BA1.1	5182**	Negative
1	4	*	201	12	Yes	No	No	No	No	No			
0	2	41	222	4	No	Yes	No	No	No	No	BA1.1		
0	3	56	288	46	Yes	No	No	No	No	No	BA.2	5212**	
1	3	77	259	20	No	Yes	No	No	No	No			
1	2	30	230	34	Yes	Yes	No	No	No	No			
0	3	*	82	6	No	No	No	No	No	No			



vaccination schemes.<sup>3,4</sup> In this scenario, the use of anti-SARS-CoV-2 monoclonal antibodies for preexposure prophylaxis has recently gained traction. The casirivimab–imdevimab combination has been shown to confer satisfactory protection against the delta variant.<sup>5,6</sup> However, both casirivimab–imdevimab and other antibodies have limited neutralizing activity against the current variants of concern (omicron sublineages BA.1, BA.1.1 and BA.2). In contrast, the cilgavimab–tixagevimab combination retains a partial *in vitro* neutralizing activity against omicron.<sup>7–9</sup> Based on these data, health authorities have authorized the use of cilgavimab–tixagevimab for preexposure prophylaxis in immunocompromised patients with a weak anti-SARS-CoV-2 antibody response after vaccination. However, the amount of clinical protection provided by this strategy remains poorly understood as clinical trials on cilgavimab–tixagevimab were undertaken before the emergence of omicron.<sup>10</sup> In this study, we report a case series of kidney transplant recipients (KTRs) who developed the omicron infection despite preexposure cilgavimab–tixagevimab administration.

## 2 | PATIENTS AND METHODS

### 2.1 | Study population

All procedures and visits occurred at the Strasbourg and Lyon University Hospitals (France). Intramuscular gluteal prophylactic injections of 150mg tixagevimab and 150mg cilgavimab were offered as of December 28, 2021. This dosage was in accordance to the Food and Drug Administration (FDA) and European Medicines Agency regulations at the time of conduction of the study. All KTRs who showed a weak serological response to SARS-CoV-2 mRNA vaccines—defined by the French health authorities as an antibody titer below 264 BAU/ml—were eligible to receive cilgavimab–tixagevimab.<sup>11,12</sup> Patients who had already received the casirivimab–imdevimab combination (i.e., non-responders to vaccination with an antibody titer below 1 BAU/ml) were not excluded since these antibodies are not protective against the omicron variant and its sublineages.

The date of last follow-up was March 13, 2022. The diagnosis of COVID-19 was based on RT-PCR of nasopharyngeal swabs and genome sequencing was performed when suitable samples were available. The anti-receptor-binding domain (RBD) IgG response and neutralizing activity against the omicron BA.1 variant were assessed within the first 30 days after cilgavimab–tixagevimab injection and no later than the first 7 days after the onset of COVID-19.

### 2.2 | SARS-CoV-2 serological assessment

Anti-RBD IgG antibodies were detected by a chemiluminescence technique using the SARS-CoV-2 IgG II Quant commercial assay

(Abbott Architect). A titer above 7.1 BAU per mL (50 arbitrary units per ml) was defined as a positive cutoff. The clinical sensitivity and specificity of this test are 98.3% (90.6%–100.0%) and 99.5%, respectively.<sup>13</sup> The indication to perform serologic screening was identical in all kidney transplant recipients followed in our outpatient clinic, that is, at 1 month after the last vaccine dose (M1), followed by M3 and M6. Serology assessments were also undertaken on the day of preexposure prophylaxis with monoclonal antibodies and 1 month thereafter.

### 2.3 | Neutralizing antibody assessment

Neutralizing antibody titers were measured with an in-house viral pseudoparticle-based assay, as previously described.<sup>2</sup> In brief, serum samples were sequentially diluted (from 1:40 to 1:1280) and incubated with BA.1 variant spike-pseudotyped lentiviral particles for 1 h at 37°C. Subsequently, this solution (100 µl) was added to 60%–80% confluent HEK293T-ACE2 cells (kindly provided by the O. Schwartz Laboratory, Institut Pasteur) seeded in 96-well plates. After 72 h, the Bright-Glo luciferase assay substrate (Promega) was added to each well and the luminescence was measured by a luminescence counter MicroBetaTriLux 1450LSC (Perkin Elmer). Results were expressed as the  $\log_{10}$  of the sample dilutions that yielded 50% inhibition of pseudoparticle infectivity ( $\log_{10}$  IC50). The neutralization efficiency—expressed as the  $\log_{10}$  of the median half-maximal effective dilution (ED50)—was calculated using GraphPad Prism 9.3.1 (GraphPad Inc.). Sera were considered positive if they were able to neutralize more than 50% SARS-CoV-2 pseudovirus at a 1:40 dilution.

### 2.4 | Statistical analysis

Continuous data are presented as medians and interquartile ranges (IQRs) and differences were analyzed using the non-parametric Mann–Whitney *U* test. Categorical variables are expressed as counts and percentages and their analysis was conducted with the Fisher's exact test. All calculations were performed using GraphPad Prism 9.3.1 (GraphPad Inc.), with all tests two-sided at a 5% level of significance.

## 3 | RESULTS

Of the 416 KTRs who received prophylactic injections of cilgavimab–tixagevimab, 39 (9.4%) developed COVID-19 (Table 1). The patient characteristics are summarized in Table 2. They were mainly men ( $n = 23$ , 59%) with a median age of 60.1 years (IQR: 52.3–71.9 years). Most of them were treated with calcineurin inhibitors ( $n = 31$ , 84%), mycophenolate mofetil/mycophenolic acid ( $n = 37$ , 95%), and steroids ( $n = 37$ , 95%). Only one patient was treated with T-depleting therapies; however, none received



TABLE 2 General characteristics of the study patients according to the hospitalization status

	Total cohort (n = 39)	Not hospitalized (n = 25)	Hospitalized (n = 14)	p
Age (years)	60.1 [52.3; 71.9]	56.0 [49.0; 63.4]	70.2 [60.7; 74.1]	<.01
Male	23 (59%)	13 (52%)	10 (71%)	.24
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.4 [22.6; 30.0]	27.4 [22; 30.7]	27.2 [24.5; 29.2]	.9
eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> ) median	46.0 [32.0; 58.5]	51.0 [36.6; 59.0]	34.0 [24.5; 42.8]	<.01
Cardiovascular disease	15 (38%)	7 (28%)	8 (57%)	.073
Diabetes	16 (41%)	10 (40%)	6 (43%)	.86
Hypertension	34 (87%)	22 (88%)	12 (86%)	1
Time elapsed from KT (years)	2.90 [1.50; 6.05]	3.17 [1.60; 4.80]	2.30 [1.18; 6.70]	.37
History of rejection	13 (33%)	10 (40%)	3 (21%)	.3
Number of vaccine doses				
2	6 (15%)	3 (12%)	3 (21%)	.87
3	27 (69%)	18 (72%)	9 (64%)	-
4	6 (15%)	4 (16%)	2 (14%)	-
T depleting therapy at induction	19 (51%)	15 (62%)	4 (31%)	.065
CNI				
Tacrolimus	26 (67%)	19 (76%)	7 (50%)	.31
Cyclosporine	5 (13%)	2 (8%)	3 (21%)	-
No	8 (21%)	4 (16%)	4 (29%)	-
MMF/MPA	37 (95%)	25 (100%)	12 (86%)	.12
mTOR inhibitor	0	0	0	
Belatacept	8 (21%)	4 (16%)	4 (29%)	.42
Steroids	35 (90%)	23 (92%)	12 (86%)	.61
SARS-CoV-2 variant				
BA1.1	9 (60%)	5 (71%)	4 (50%)	.28
BA.1	5 (33%)	1 (14%)	4 (50%)	-
BA.2	1 (6.7%)	1 (14%)	0 (0%)	-
Time elapsed from tixagevimab-cilgavimab injection (days)	20.0 [9.50; 34.5]	12.0 [6.00; 32.0]	29.0 [17.5; 35.8]	.04
ICU	3 (7.7%)	0 (0%)	3 (21%)	.04
Death	2 (5.1%)	0 (0%)	2 (14%)	.12

Note: Data are expressed as median (interquartile range) or n (%).

Abbreviations: BMI, body mass index; CNI, calcineurin inhibitor; eGFR, estimated glomerular filtration rate; ICU, intensive care unit; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; mTOR, mammalian target of rapamycin.

rituximab during the previous year. In addition, none of them had a previous history of symptomatic COVID-19. All had been previously vaccinated against SARS-CoV-2 with an mRNA-based vaccine (22 with the mRNA-1273 vaccine, 15 with the BNT162b2 vaccine, and 2 with both) but failed to develop a protective humoral response. Three were vaccinated before transplantation and the remaining 36 thereafter. The time interval between the last vaccine dose and the serology measurement ranged from 39 days to 322 days. The time interval from the receipt of the most recent vaccine dose to COVID-19 infection ranged from 49 days to 351 days. From August 17, 2022, to December 22, 2022, a total of 25 patients were treated with casirivimab-imdevimab. The

time interval between casirivimab-imdevimab and tixagevimab-cilgavimab administration ranged from 23 days to 138 days. The median time elapsed from cilgavimab-tixagevimab injections to the onset of COVID-19 was 20 days (IQR: 9.5–34.5 days). With the exception of one patient, all KTRs were symptomatic. Hospitalization was required for 14 patients (35.9%) of whom three were transferred to intensive care unit. Two KTRs died of COVID-19-related acute respiratory distress syndrome. Compared with cases managed on an outpatient basis, hospitalized patients were older (median: 70.2 years vs. 56 years, respectively,  $p < .01$ ), had a lower estimated glomerular filtration rate (median: 34 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> vs. 51 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>, respectively,

$p < .01$ ), and a longer time elapsed from cilgavimab–tixagevimab injection (median: 29 days vs. 12 days, respectively,  $p = .04$ , Table 2). SARS-CoV-2 sequencing was carried out in 15 cases (BA.1,  $n = 5$ ; BA.1.1,  $n = 9$ ; BA.2,  $n = 1$ ). Viral neutralizing activity of the serum was negative in the 12 tested patients (five hospitalized patients and seven managed in an outpatient setting), suggesting that this prophylaxis strategy does not provide sufficient protection against this SARS-CoV-2 variant of concern. Five patients had anti-RBD IgG titers  $< 3500$  BAU/mL. In the remaining seven patients, preexisting casirivimab–imdevimab administration did not allow interpreting anti-RBD IgG levels.

## 4 | DISCUSSION AND CONCLUSIONS

In this study, we describe the occurrence of severe omicron infections despite prophylactic administration of cilgavimab–tixagevimab. Notably, two study participants died of COVID-19. Previous investigations have shown that the BA.1.1 subvariant is characterized by a higher in vitro resistance to cilgavimab–tixagevimab compared with the BA.1 variant.<sup>8,9</sup> The former genotype was predominant in our cohort, which can at least in part explain the disappointing level of protection observed in these patients. However, this issue is unlikely to be the only explanation for our findings; accordingly, we also observed that none of the sera collected after administration of cilgavimab–tixagevimab was able to neutralize the BA.1 variant in vitro. These results suggest that intramuscular injections of a combination of 150 mg tixagevimab and 150 mg cilgavimab might not be sufficient to elicit protective levels of circulating anti-RBD antibodies. Our data are in accordance with those obtained in a cohort of 63 KTRs who did not develop COVID-19;<sup>14</sup> in this sample, only 9.5% of all participants was able to neutralize the omicron variant 1 month after cilgavimab–tixagevimab administration. This percentage was markedly lower than that observed in patients who had been previously infected with SARS-CoV-2 (71%; 10/14).<sup>14</sup>

Our clinical findings confirm recent FDA recommendations, derived from in vitro models, underlining the necessity to increase the dose of cilgavimab–tixagevimab.<sup>8</sup> However, the European Medicines Agency is still recommending a dose of 150 mg for each antibody. Information on the effectiveness of higher antibody doses would have been interesting; however, as an increased dosage is not currently recommended, we are unable to provide these data. Further pharmacokinetic studies are warranted to determine the optimal dose of cilgavimab–tixagevimab for primary prophylaxis of COVID-19. Additional research is also required to investigate whether an increased tixagevimab–cilgavimab dosage would be sufficient to protect immunocompromised patients against the omicron variant and its sublineages. Under these circumstances, KTRs should be advised to maintain strict sanitary protection measures and receive booster doses.

## DISCLOSURE

Sophie Caillard and Olivier Thauat received consulting fees from Astra Zeneca. All other authors declare that they have no conflict of interest.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data supporting the findings from this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## ORCID

Ilies Benotmane  <https://orcid.org/0000-0001-9113-2479>

Gabriela Gautier-Vargas  <https://orcid.org/0000-0001-9377-1055>

Jérôme Olagne  <https://orcid.org/0000-0001-6792-5399>

Noëlle Cognard  <https://orcid.org/0000-0001-6602-2059>

Samira Fafi-Kremer  <https://orcid.org/0000-0003-3886-7833>

Olivier Thauat  <https://orcid.org/0000-0002-3648-8963>

Sophie Caillard  <https://orcid.org/0000-0002-0525-4291>

## REFERENCES

1. Caillard S, Anglicheau D, Matignon M, et al. An initial report from the French SOT COVID registry suggests high mortality due to COVID-19 in recipients of kidney transplants. *Kidney Int.* 2020;98(6):1549-1558.
2. Charmetant X, Espi M, Benotmane I, et al. Infection or a third dose of mRNA vaccine elicits neutralizing antibody responses against SARS-CoV-2 in kidney transplant recipients. *Sci Transl Med.* 2022;14(636):eabl6141.
3. Benotmane I, Gautier G, Perrin P, et al. Antibody response after a third dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant recipients with minimal serologic response to 2 doses. *JAMA.* 2021;23:1063.
4. Caillard S, Thauat O, Benotmane I, Masset C, Blanco G. Antibody response to a fourth messenger RNA COVID-19 vaccine dose in kidney transplant recipients: a case series. *Ann Intern Med.* 2022;175(3):455-456.
5. Ducloux D, Courivaud C. REGEN-Cov antibody combination to prevent COVID-19 infection in kidney transplant recipient without detectable antibody response to optimal vaccine scheme. *Kidney Int.* 2022;101(3):645-646.
6. Isa F, Forleo-Neto E, Meyer J, et al. Repeat Subcutaneous Administration of REGEN-COV® in Adults Is Well-Tolerated and Prevents the Occurrence of COVID-19. *Infectious Diseases (except HIV/AIDS)*; 2021. [10.1101/2021.11.10.21265889](https://doi.org/10.1101/2021.11.10.21265889)
7. Takashita E, Kinoshita N, Yamayoshi S, et al. Efficacy of antiviral agents against the SARS-CoV-2 Omicron subvariant BA.2. *N Engl J Med.* 2022;386(15):1475-1477.
8. Center for Drug Evaluation and Research. FDA authorizes revisions to Evusheld dosing. FDA. Published online February 24, 2022. Accessed March 5, 2022. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-authorizes-revisions-evusheld-dosing>
9. Liu L, Iketani S, Guo Y, et al. Striking antibody evasion manifested by the omicron variant of SARS-CoV-2. *Nature.* 2022;602(7898):676-681.
10. Levin MJ, Ustianowski A, De Wit S, et al. LB5. PROVENT: phase 3 study of efficacy and safety of AZD7442 (tixagevimab/cilgavimab) for pre-exposure prophylaxis of COVID-19 in adults. *Open Forum Infect Dis.* 2021;8(Supplement\_1):S810.
11. Caillard S, Thauat O. COVID-19 vaccination in kidney transplant recipients. *Nat Rev Nephrol.* 2021;17(12):785-787.

12. EVUSHELD (tixagévimab/cilgavimab). Haute Autorité de Santé. Accessed March 6, 2022. [https://www.has-sante.fr/jcms/p\\_3304034/fr/evusheld-tixagevimab/cilgavimab](https://www.has-sante.fr/jcms/p_3304034/fr/evusheld-tixagevimab/cilgavimab)
13. English E, Cook LE, Picc I, Dervisevic S, Fraser WD, John WG. Performance of the Abbott SARS-CoV-2 IgG II quantitative antibody assay including the new variants of concern, VOC 202012/V1 (United Kingdom) and VOC 202012/V2 (South Africa), and first steps towards global harmonization of COVID-19 antibody methods. *J Clin Microbiol.* 2021;59(9):e0028821.
14. Benotmane I, Velay A, Vargas G, et al. Pre-exposure prophylaxis with Evusheld™ elicits limited neutralizing activity against the omicron variant in kidney transplant patients. *Kidney Int.* Published online May 24, 2022.

**How to cite this article:** Benotmane I, Velay A, Gautier-Vargas G, et al. Breakthrough COVID-19 cases despite prophylaxis with 150 mg of tixagevimab and 150 mg of cilgavimab in kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2022;00:1-7. doi: [10.1111/ajt.17121](https://doi.org/10.1111/ajt.17121)

## Pre-exposure prophylaxis with 300 mg Evusheld elicits limited neutralizing activity against the Omicron variant

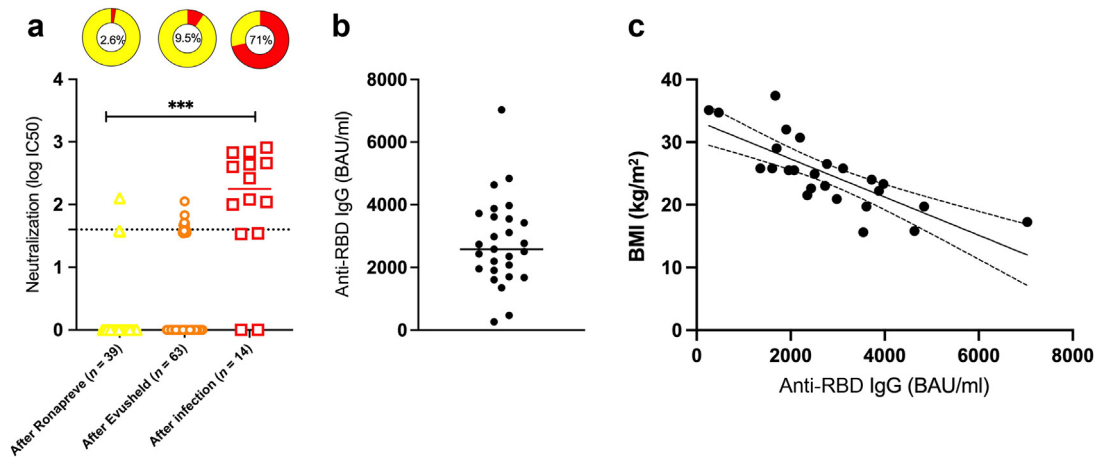
**To the editor:** Immunocompromised patients show an impaired vaccine-induced immune response, resulting in an

increased risk of severe coronavirus disease 2019 (COVID-19).<sup>1</sup> In an effort to address this issue, health authorities in the US and various European countries have subsequently authorized the use of anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) monoclonal antibodies for pre-exposure prophylaxis. Although the combination of casirivimab–imdevimab (Ronapreve, Roche Regeneron) has been shown to confer satisfactory protection against the Delta variant, it has limited neutralizing activity against Omicron.<sup>2</sup> In March 2022, the combination of cilgavimab–tixagevimab (Evusheld, AstraZeneca) was approved in the UK for protecting transplant recipients with poor response to vaccination against the Omicron variant.<sup>3</sup> In France also, Evusheld was granted approval as of December, 2021. Although the Phase III Double-blind, Placebo-controlled Study of AZD7442 for Pre-exposure Prophylaxis of COVID-19 in Adult (PROVENT) study showed good efficacy for 300 mg Evusheld in the context of Delta-variant circulation, the question of whether this dosage is sufficient to prevent Omicron infection remains unanswered. Previous data indicated that the serum-neutralizing capacity against SARS-CoV-2 is positively associated with protection against severe forms of COVID-19.<sup>4</sup> Here, we analyzed the neutralizing capacity of Evusheld against Omicron in a cohort of kidney transplant recipients who received the drug for pre-exposure prophylaxis.

Both anti-receptor binding domain (RBD) IgG titers and neutralizing antibody titers against the Omicron BA.1 variant were measured in serum samples collected from 63 adult kidney transplant recipients who received gluteal i.m. prophylactic injections of Evusheld (150 mg tixagevimab and 150 mg cilgavimab) in the Lyon and Strasbourg University Hospitals. Recipients with a history of COVID-19 or positive anti-nucleocapsid IgG were excluded. Patients who received prophylactic Ronapreve (600 mg casirivimab and 600 mg imdevimab,  $n = 39$ ) and those who were infected with SARS-CoV-2 during the fifth wave of the pandemic ( $n = 14$ ) were used as the negative and positive control groups, respectively. The study protocol was approved by the local ethics committees (identifier: DC-2013-1990 and DC-2021-4460), and written informed consent was obtained from all participants.

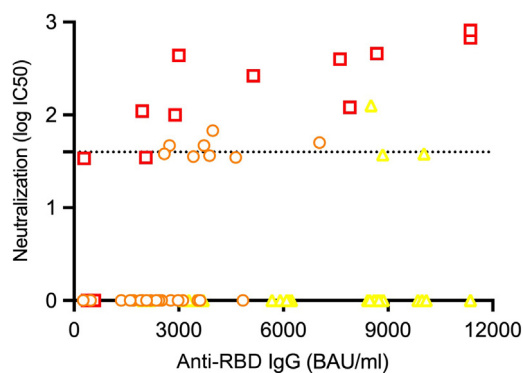
After a median interval from injection of 29 days (interquartile range: 29–33 days), patients who received Evusheld had a low level of neutralizing activity (Figure 1a), and only 9.5% of them (6 of 63) were able to neutralize the Omicron variant, compared with 71% of patients (10 of 14) who were infected with SARS-CoV-2, and 2.6% (1 of 39) of those who received Ronapreve. Interestingly, convalescent patients displayed higher levels of neutralizing antibodies than those who received Evusheld (median: 2.3 log IC50, interquartile range: 1.5–2.7 vs. 0.00 log IC50, interquartile range: 0–0.05;  $P < 0.001$ ). Although anti-RBD IgG titers were generally low after Evusheld injection (median: 2583 binding antibody units (BAU)/ml, interquartile range: 1906–3611 BAU/ml), a high interindividual variability was observed (range: 262–7032 BAU/ml; Figure 1b). This variability was explained largely by the patients' body mass index, which showed an inverse





**Figure 1 | (a) Serum-neutralizing IgG titers (log IC50) measured with a previously described in-house viral pseudoparticle-based assay<sup>4</sup> in 3 groups of kidney transplant recipients.** Orange circles denote titers measured at 28 days post-injection in patients ( $n = 63$ ) who received Evusheld (300 mg; AstraZeneca), whereas yellow triangles indicate titers quantified at 31 days post-injection in patients ( $n = 39$ ) who received Ronapreve (1200 mg; Roche Regeneron). Red squares denote titers measured at 27 days post-infection in patients ( $n = 14$ ) infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Dotted line represents the neutralizing positivity threshold (1.6 log IC50). Groups were compared with the Kruskal-Wallis test. The contingency graphs at the bottom of the figure indicate the percentages of patients with neutralizing activity in each group (with positive in red and negative in yellow; the percentage is reported in the middle). **(b)** Anti-receptor binding domain (RBD) IgG titers (binding antibody units [BAU]/ml, Abbott Architect) 28 days after Evusheld injection (300 mg) in 27 patients who did not receive Ronapreve™ before Evusheld. **(c)** Correlation between body mass index ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) and anti-RBD IgG titers (BAU/ml, Abbott Architect) 28 days after Evusheld injection (300 mg) in 27 patients who did not receive Ronapreve before Evusheld;  $r^2 = 0.595$ . BMI, body mass index.

correlation with anti-RBD IgG titers (Figure 1c). Further analysis revealed that participants with anti-RBD titers  $<2500$  BAU/ml after Evusheld injection had no neutralizing activity (Figure 2). Furthermore, 7 patients of this cohort developed symptomatic COVID-19, including 2 who required hospitalization. All had negative neutralizing activity at the time of infection diagnosis.



**Figure 2 | Correlation between anti-receptor binding domain (RBD) IgG (Abbott Architect) and neutralizing antibody titers<sup>3</sup> in 3 groups of kidney transplant recipients.** Orange circles denote titers measured at 28 days post-injection in patients ( $n = 63$ ) who received Evusheld (300 mg; AstraZeneca), and yellow triangles indicate titers quantified at 31 days post-injection in patients ( $n = 39$ ) who received Ronapreve (300 mg; Roche Regeneron). Red squares denote titers measured at 27 days post-infection in patients ( $n = 14$ ) who were infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). BAU, binding antibody units.

Taken together, these data indicate that less than 10% of patients who received Evusheld were able to neutralize the Omicron BA.1 variant at 29 days post-injection. Therefore, the dose of 300 mg Evusheld is likely insufficient to achieve the required neutralization activity *in vivo*. These findings corroborate those of a recent study conducted in transplant recipients who received 3 vaccine doses<sup>5</sup>; specifically, the authors reported that anti-RBD levels associated with serum neutralizing activity against Omicron in this population were approximately 8500 BAU/ml.<sup>5</sup> Finally, our study also supports recent FDA recommendations,<sup>6</sup> derived from *in vitro* models, regarding the need to increase the dose of Evusheld. To our knowledge, data on the effectiveness of tixagevimab–cilgavimab in the prevention of Omicron BA.2 infection have not yet been published. Research aimed at assessing the correlation between anti-RBD titers after Evusheld administration and the *in vivo* neutralizing capacity against the BA.2 Omicron variant is currently ongoing.

**DISCLOSURE**

SC and OT have received consultant fees from AstraZeneca. All the other authors declared no competing interests.

1. Caillard S, Thauat O. COVID-19 vaccination in kidney transplant recipients. *Nat Rev Nephrol.* 2021;17:785–787.
2. Planas D, Saunders N, Maes P, et al. Considerable escape of SARS-CoV-2 Omicron to antibody neutralization. *Nature.* 2022;602:671–675.
3. UK Medicines and Healthcare products Regulatory Agency. Regulatory approval of Evusheld (tixagevimab/cilgavimab). Accessed March 17, 2022. <https://www.gov.uk/government/publications/regulatory-approval-of-evusheld-tixagevimab/cilgavimab>

4. Charmetant X, Espi M, Benotmane I, et al. Infection or a third dose of mRNA vaccine elicit neutralizing antibody responses against SARS-CoV-2 in kidney transplant recipients. *Sci Transl Med.* 2022;14:eabl6141.
5. Kumar D, Hu Q, Samson R, et al. Neutralization against Omicron variant in transplant recipients after three doses of mRNA vaccine. *Am J Transplant.* Published online March 10, 2022. <https://doi.org/10.1111/ajt.17020>
6. US Food & Drug Administration. FDA authorizes revisions to Evusheld dosing. Accessed February 24, 2022. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-authorizes-revisions-evusheld-dosing>

Ilies Benotmane<sup>1</sup>, Aurélie Velay<sup>2</sup>, Gabriela Gautier-Vargas<sup>1</sup>, Jérôme Olagne<sup>1</sup>, Olivier Thauinat<sup>2</sup>, Samira Fafi-Kremer<sup>3</sup> and Sophie Caillard<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Nephrology and Transplantation, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France; <sup>2</sup>Department of Transplantation, Nephrology and Clinical Immunology, Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, Lyon, France; and <sup>3</sup>Department of Virology, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

**Correspondence:** Sophie Caillard, Department of Nephrology, Dialysis and Transplantation, Strasbourg University Hospital, 1 place de l'hôpital, Strasbourg 67091, France. E-mail: [Sophie.caillard@chru-strasbourg.fr](mailto:Sophie.caillard@chru-strasbourg.fr)

*Kidney International* (2022) **102**, 442–444; <https://doi.org/10.1016/j.kint.2022.05.008>

Copyright © 2022, International Society of Nephrology. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.



## A rapid decline in the anti-receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein IgG titer in kidney transplant recipients after tixagevimab–cilgavimab administration

**To the editor:** Immunocompromised patients are at high risk of severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) and show an impaired anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) vaccine response, even after 4 vaccine doses.<sup>1,2</sup> In this population, monoclonal antibodies that are used as a preexposure prophylactic treatment significantly reduce the incidence of severe infections. Since the emergence of the Omicron variant and its sublineages, tixagevimab–cilgavimab has been shown to be the only effective monoclonal combination therapy.<sup>3</sup> According to the PROVENT (*Prophylaxis Prevention*) study,<sup>4</sup> the efficacy of tixagevimab–cilgavimab is estimated to last at least 6 months; however, the study was conducted before the Omicron era. Herein, we describe the long-term anti-receptor-binding domain (RBD) kinetics in a single-center cohort of kidney transplant recipients treated with tixagevimab–cilgavimab for preexposure prophylaxis.

Immunocompromised patients with a weak antibody response after a complete vaccine program (anti-spike IgG <264 binding antibody units [BAUs]/ml) or for whom a vaccine administration contraindication was identified were eligible for this treatment. Patients with a history of COVID-19 after tixagevimab–cilgavimab administration were excluded (n = 56). Anti-RBD IgG titers were measured in serum samples collected from 98 adult kidney transplant recipients who received gluteal injections of 150 mg tixagevimab and 150 mg cilgavimab in the Strasbourg University Hospital (Strasbourg, France). Of these patients, 72 had been previously treated with the casirivimab–imdevimab combination before the emergence of the Omicron variant. The kinetics of neutralization against the Omicron BA.2 variant, which was predominant at the time of writing, were investigated in a subgroup of 18 patients. The study protocol was approved by the local ethics committee (identifier: DC-2013–1990), and written informed consent was obtained from all participants.

Patient characteristics are presented in [Table 1](#). A total of 96 of 98 patients were vaccinated with at least 2 doses of anti-SARS-CoV-2 mRNA vaccine. The median time between the last vaccination and tixagevimab–cilgavimab administration was 227 days (interquartile range [IQR], 190–257 days). In the subgroup of 26 patients not previously treated with the casirivimab–imdevimab combination, the median anti-RBD IgG titer was 19 BAUs/ml (IQR, 3–120 BAUs/ml) before

tixagevimab–cilgavimab administration, after which it increased to 2753 BAUs/ml (IQR, 2321–3124 BAUs/ml;  $P < 0.0001$ ) after a median of 30 days (IQR, 26–37 days) and then finally decreased to 1293 BAUs/ml (IQR, 1070–1627 BAUs/ml;  $P < 0.0001$ ) after a median of 111 days (IQR, 95–125 days; [Figure 1a](#)<sup>5</sup>). The anti-RBD titer decreased by a median of 53% (IQR, 45%–59%). With the exception of 1 patient, all participants had an anti-RBD titer <2500 BAUs/ml, which has been previously associated with the lack of neutralizing activity against the Omicron BA.1 variant.<sup>5</sup>

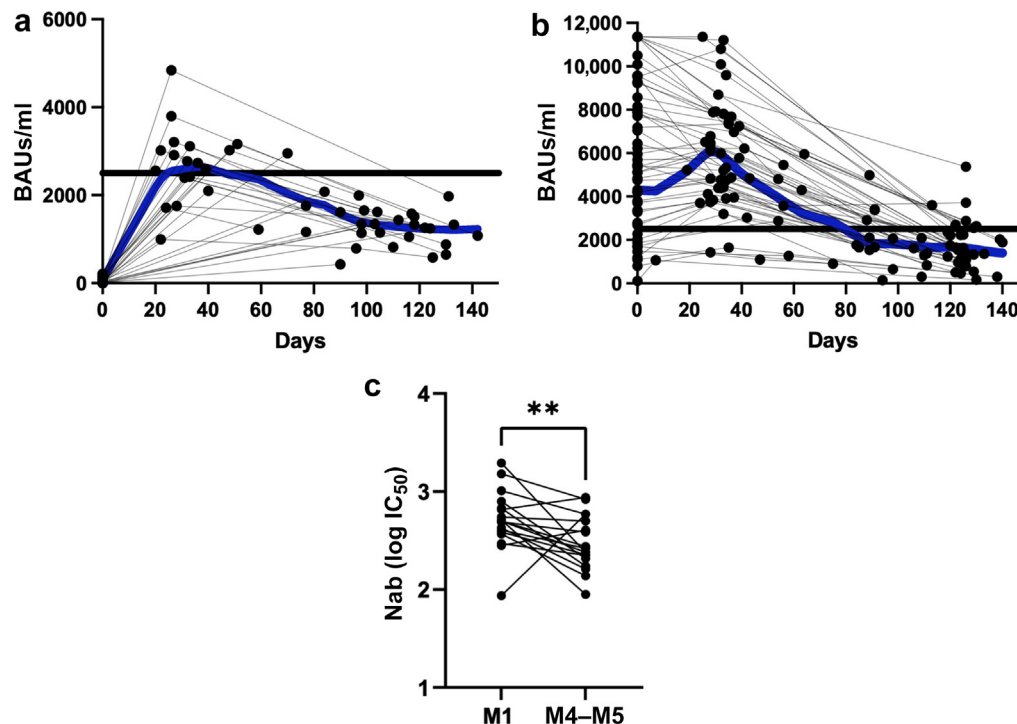
For the remaining 72 patients, the last casirivimab–imdevimab administration had been performed with a median of 57 days (IQR, 34.8–70.8 days) before the tixagevimab–cilgavimab injection. The median anti-RBD IgG titer was 5500 BAUs/ml (IQR, 3629–8470 BAUs/ml) before tixagevimab–cilgavimab administration; and then it stabilized at 5213 BAUs/ml (IQR, 3897–7269 BAUs/ml;  $P = 0.17$ ) after a median of 33 days (IQR, 28–37 days) and declined to 1824 BAUs/ml (IQR, 1207–2882 BAUs/ml;  $P < 0.0001$ ) after a median of 119 days (IQR, 94–125 days; [Figure 1b](#)).

In a subgroup of 18 patients, the neutralizing activity decreased from 2.7 log<sub>10</sub> (IQR, 2.59–2.85 log<sub>10</sub>) to 2.4 log<sub>10</sub> (IQR, 2.3–2.72 log<sub>10</sub>;  $P = 0.007$ ; [Figure 1c](#)). The neutralizing

**Table 1 | Characteristics of kidney transplant recipients who received prophylactic injections of tixagevimab–cilgavimab**

Variables	Kidney transplant recipients (n = 98)
Age, yr	55.5 [50.0–67.8]
Male sex	53 (54)
Comorbidities	
BMI, kg/m <sup>2</sup>	24.9 [22.2–28.8]
Cardiovascular disease	26 (27)
Diabetes	32 (33)
Hypertension	89 (91)
Time from kidney transplantation, yr	3.69 [1.52–8.25]
First transplantation	74 (76)
Deceased donor	83 (85)
CNI	
Tacrolimus	66 (67)
Cyclosporine	20 (20)
No CNI	12 (12)
MMF/MPA	85 (87)
mTOR inhibitors	9 (9.2)
Belatacept	12 (12.2)
Steroids	77 (79)
Serum creatinine, μmol/L	142 [108–179]
No. of vaccine doses	
0	2 (2)
2	3 (3.1)
3	73 (74)
4	19 (19)
5	1 (1)
Time between the last dose vaccine and tixagevimab–cilgavimab administration, d	227 [190–257]

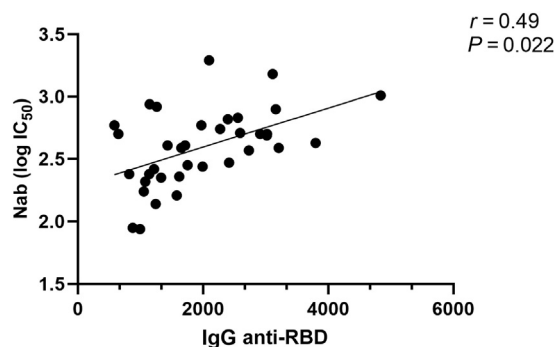
BMI, body mass index; CNI, calcineurin inhibitor; MMF, mycophenolate mofetil; MPA, mycophenolic acid; mTOR, mammalian target of rapamycin. Data are expressed as median [interquartile range] or n (%).



**Figure 1 | Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) anti-receptor-binding domain IgG titer kinetics tested by ARCHITECT IgG II Quant test (Abbott).** Results in arbitrary units/ml specific of this assay were converted into binding antibody units (BAUs)/ml adapted to the World Health Organization standard for SARS-CoV-2 Ig by multiplying them by the factor 0.142 (assay range, 1–11,360 BAUs/ml). Titers are represented from the day of tixagevimab–cilgavimab administration for patients previously treated with the casirivimab–imdevimab combination ( $n = 72$ ; **b**) or not ( $n = 26$ ; **a**). For 28 patients, data were missing around 1 month after antibody administration. The black lines represent the threshold below which no neutralizing activity against the Omicron BA.1 variant was detected in our previous study.<sup>5</sup> The thick blue lines indicate the trend in antibody titer using smoothing splines. The kinetics of neutralization were investigated in a subgroup of 18 patients, and a significant decrease was observed between 1 month (M1) and 4 to 5 months (M4–M5) following tixagevimab–cilgavimab injection (**c**).  $**P = 0.007$ . IC<sub>50</sub>, 50% inhibitory concentration; Nab, neutralizing antibody.

activity against the BA.2 variant was positively associated with anti-RBD titers (Spearman  $\rho = 0.49$ ;  $P = 0.02$ ; Figure 2).

In this study, we show, for the first time, a significant decrease of the anti-RBD IgG 4 to 5 months after the administration of 150 mg of tixagevimab and 150 mg of cilgavimab. The PROVENT study demonstrated a



**Figure 2 | Scattergram and regression line showing a significant positive correlation between anti-receptor-binding domain (RBD) IgG (Abbott Architect) and neutralizing antibody (Nab) titers (Spearman  $\rho = 0.49$ ;  $P = 0.02$ ).** IC<sub>50</sub>, 50% inhibitory concentration.

persistent neutralizing activity against pre-Omicron variants for 6 months after tixagevimab–cilgavimab administration, despite a progressive decrease in drug concentration.<sup>4</sup> As the neutralizing activity is already reduced against the Omicron variant *in vitro* and *in vivo* 1 month after the injection,<sup>5–7</sup> the significant decrease in anti-RBD titers indicates a potential rapid loss of efficacy and an increased risk of severe COVID-19 in transplant recipients. Despite the fact that all of the sera tested within 4 to 5 months after a 150-mg dose of tixagevimab and cilgavimab each exhibited neutralizing activity against BA.2, it should be kept in mind that the currently predominant variant (BA.5) is characterized by a higher resistance against tixagevimab–cilgavimab. In this regard, the BA.5 variant poses similar concerns as the BA.1 variant in light of their similar escape profile.<sup>8</sup> Unfortunately, we have previously shown that <10% of patients exhibited neutralizing activity against BA.1 1 month after tixagevimab–cilgavimab injection.<sup>5</sup> Moreover, in our cohort, 73 patients (74%) had a titer <2500 BAUs/ml after a median of 117 days (IQR, 94–125 days), which was associated with the absence of neutralizing activity against the Omicron BA.1 variant.<sup>6</sup>



Despite the small sample of our study, our data suggest the necessity to administer another tixagevimab–cilgavimab dose before 6 months, especially when the monoclonal cocktail was given at the dose of 150 mg of each antibody. Additional research is needed to investigate the impact and the antibody kinetic of the higher dose of 600 mg of tixagevimab–cilgavimab, which is currently approved in the United States, but not in European countries. Furthermore, the dose required to reach neutralizing titers against different Omicron sublineages should be determined. Recent evidence indicates that an additional 150-mg dose of tixagevimab and cilgavimab each can improve the neutralizing activity against the BA.2 variant, although this was not the case for the BA.1 variant.<sup>9</sup> This can be attributed to the high resistance of the latter variant to tixagevimab–cilgavimab, which would require even higher antibody doses for neutralization. The BA.5 variant, which is currently predominant, poses the same concern as the BA.1 variant in light of its similar escape profile. There is an unmet need to develop more specific monoclonal antibodies to address this clinical issue. Pharmacokinetic studies will also be needed to support dose selection.

#### DISCLOSURE

SC reports receiving travel grants from Astellas and Sanofi, consulting fees from AstraZeneca, and lecture honoraria from Alexion. All the other authors declared no competing interests.

- Caillard S, Chavarot N, Francois H, et al. Is COVID-19 infection more severe in kidney transplant recipients? *Am J Transplant*. 2021;21:1295–1303.
- Caillard S, Thaunat O, Benotmane I, et al. Antibody response to a fourth messenger RNA COVID-19 vaccine dose in kidney transplant recipients: a case series. *Ann Intern Med*. 2022;175:455–456.
- Ducloux D, Courivaud C. REGEN-Cov antibody combination to prevent COVID-19 infection in kidney transplant recipient without detectable antibody response to optimal vaccine scheme. *Kidney Int*. 2022;101:645–646.
- Levin MJ, Ustianowski A, De Wit S, et al. Intramuscular AZD7442 (tixagevimab–cilgavimab) for prevention of Covid-19. *N Engl J Med*. 2022;386:2188–2200.
- Benotmane I, Velay A, Gautier-Vargas G, et al. Pre-exposure prophylaxis with 300 mg Evusheld elicits limited neutralizing activity against the Omicron variant. *Kidney Int*. 2022;102:442–444.
- Bruel T, Hadjadj J, Maes P, et al. Serum neutralization of SARS-CoV-2 Omicron sublineages BA.1 and BA.2 in patients receiving monoclonal antibodies. *Nat Med*. 2022;28:1297–1302.
- Benotmane I, Velay A, Gautier-Vargas G, et al. Breakthrough COVID-19 cases despite prophylaxis with 150 mg of tixagevimab and 150 mg of cilgavimab in kidney transplant recipients. Published online June 17, 2022. *Am J Transplant*. <https://doi.org/10.1111/ajt.17121>
- Tuekprakhon A, Nutalai R, Djokaite-Guraliuc A, et al. Antibody escape of SARS-CoV-2 Omicron BA.4 and BA.5 from vaccine and BA.1 serum. *Cell*. 2022;185:2422–2433. e13.
- Karaba AH, Kim JD, Chiang TPY, et al. Omicron BA.1 and BA.2 neutralizing activity following pre-exposure prophylaxis with tixagevimab plus cilgavimab in vaccinated solid organ transplant recipients. Preprint. Posted online May 26, 2022. *medRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.05.24.22275467>

Ilies Benotmane<sup>1,2</sup>, Aurélie Velay<sup>2,3</sup>, Gabriela-Gautier Vargas<sup>1</sup>, Jérôme Olagne<sup>1</sup>, Noëlle Cognard<sup>1</sup>, Françoise Heibel<sup>1</sup>, Laura Braun-Parvez<sup>1</sup>, Jonas Martzloff<sup>1</sup>, Peggy Perrin<sup>1</sup>, Romain Pszczolinski<sup>1</sup>, Bruno Moulin<sup>1,2</sup>, Samira Fafi-Kremer<sup>2,3</sup> and Sophie Caillard<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Nephrology Dialysis and Transplantation, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France; <sup>2</sup>Unité mixte de recherche (UMR) S1109 Labex Transplantex, Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm) Fédération de Médecine Translationnelle, Strasbourg University, Strasbourg France; and <sup>3</sup>Department of Virology, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

**Correspondence:** Ilies Benotmane, Department of Nephrology Dialysis and Transplantation, University Hospital Centre Strasbourg, place de l'hôpital, Strasbourg, bas rhin 67091, France. E-mail: [ilies.benotmane@chru-strasbourg.fr](mailto:ilies.benotmane@chru-strasbourg.fr)

*Kidney International* (2022) ■, ■–■; <https://doi.org/10.1016/j.kint.2022.07.022>

Copyright © 2022, International Society of Nephrology. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.



### Résumé

Les transplantés rénaux sont exposés à un sur-risque infectieux. Ces infections sont une cause majeure de morbi-mortalité dans cette population. Nous nous sommes intéressés à une infection virale opportuniste chronique par le BK polyomavirus (BKPyV) puis nous avons abordé l'impact d'une infection virale aiguë par le SARS-CoV-2 chez le transplanté rénal.

Le BKPyV peut conduire à la perte du greffon rénal. Aucun traitement spécifique n'existe à ce jour. Notre étude s'est intéressée à la prévention de la réplication du virus par des immunoglobulines intraveineuses (IgIV). Elle a montré que les personnes présentant des faibles titres d'anticorps neutralisants anti-BKPyV et qui sont à haut risque de néphropathie à BKPyV pourraient avoir un bénéfice à être traitées par IgIV durant les trois premiers mois de la greffe.

Nous nous sommes par la suite intéressés au SARS-CoV-2. Le transplanté rénal présente une morbi-mortalité liée à ce virus plus importante que l'immunocompétent. Dans notre cohorte, les marqueurs de relargage cytokinique permettaient de prédire cette morbi-mortalité. Nous avons montré la présence d'une excrétion virale viable prolongée avec un risque important de contamination et de mutation du virus. Enfin, l'étude de la réponse vaccinale anti-SARS-CoV-2 rapporte une réponse faible malgré l'administration de multiples doses. Les comorbidités et l'immunosuppression sont les principaux facteurs de risque de la faible réponse vaccinale. Nos données nous ont permis de construire un score prédictif de cette réponse vaccinale.

**Mots clés :** immunodéprimés, transplanté rénal, BK polyomavirus, SARS-CoV-2, COVID-19, anticorps neutralisants

### Résumé en anglais

Kidney transplant recipients (KTR) are exposed to an increased risk of infection. These infections are a major cause of morbidity and mortality in this population of renal transplant recipients.

BKPyV can lead to kidney graft loss. No specific treatment currently exists. Our study investigated the prevention of virus replication by intravenous immunoglobulins (IVIg) and showed that people with low anti-BKPyV neutralizing antibody titers who are at high risk of BKPyV nephropathy may have a benefit from being treated with IVIg during the first three months of the transplant.

We then studied SARS-CoV-2. The KTR present a greater morbidity and mortality linked to this virus than the immunocompetent. In our cohort, markers of cytokine release syndrome predicted this morbidity and mortality. We showed the presence of prolonged viable viral excretion with a significant risk of contamination and mutation of the virus. Finally, the study of the anti-SARS-CoV-2 vaccine response reports a weak response despite the administration of multiple doses. Comorbidities and immunosuppression are the main risk factors for poor vaccine response. Our data allowed us to construct a predictive score for this vaccine response.

**Keywords:** immunocompromised, kidney transplant recipients, BK polyomavirus, SARS-CoV-2, COVID-19, neutralizing antibodies