

Desempenho de métodos diagnósticos no rastreamento de nefropatia pelo vírus BK em pacientes transplantados renais

Screening for BK virus nephropathy in kidney transplant recipients: comparison of diagnostic tests

Autores

Gabriel Godinho Pinto¹
 Jose Antonio T Poloni^{1,2}
 Liane N. Rotta¹
 Raymund R. Razonable^{3,4}
 Alessandro C. Pasqualotto^{1,2}

¹ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

² Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

³ William J. von Liebig Transplant Center.

⁴ College of Medicine, Mayo Clinic.

RESUMO

A citologia urinária e a reação da cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) em amostras de sangue e/ou urina são comumente utilizados para rastrear nefropatia associada ao polyomavirus (PVAN), em pacientes transplantados renais. Entretanto, poucos estudos comparam diretamente esses testes diagnósticos quanto ao desempenho para prever esta complicação. Aqui realizamos uma revisão sistemática na qual foram estudados pacientes transplantados renais adultos (≥ 18 anos). Uma pesquisa estruturada Pubmed foi utilizada para identificar estudos comparando citologia urinária e/ou qPCR em amostras de urina e plasma para detectar PVAN, utilizando a biópsia renal como padrão-ouro para o diagnóstico. Dentre os 707 artigos em potencial, apenas 12 atendiam aos critérios de inclusão e foram analisados em maior detalhe. Foram incluídos 1694 pacientes transplantados renais, entre os quais 115 (6,8%) classificados com PVAN presuntivo e 57 (3,4%) PVAN confirmado. Nessa revisão sistemática, o qPCR no plasma teve melhor desempenho para PVAN em comparação com citopatologia urinária.

Palavras-chave: biologia celular; biópsia; DNA; transplante de rim; vírus BK.

ABSTRACT

Urine cytology and qPCR in blood and urine are commonly used to screen renal transplant recipients for polyomavirus-associated nephropathy (PVAN). Few studies, however, have directly compared these two diagnostic tests, in terms of their performance to predict PVAN. This was a systematic review in which adult (≥ 18 years old) renal transplant recipients were studied. A structured Pubmed search was used to identify studies comparing urine cytology and/or qPCR in urine and plasma samples for detecting PVAN with renal biopsy as the gold standard for diagnosis. From 707 potential papers, there were only twelve articles that matched the inclusion criteria and were analyzed in detail. Among 1694 renal transplant recipients that were included in the review, there were 115 (6.8%) patients with presumptive PVAN and 57 (3.4%) PVAN confirmed. In this systematic review, the qPCR in plasma had better performance for PVAN compared to urine cytopathology.

Keywords: biopsy; BK virus; cell biology; DNA; kidney transplantation.

INTRODUÇÃO

Transplante renal é o tratamento de escolha para muitas doenças renais em estágio terminal, que normalmente exigiriam diálise e terapia renal substitutiva.¹ Uma das principais ameaças à sobrevivência do enxerto é infecção causada pelo poliomavírus BK (BKV). A prevalência de reativação clinicamente significativa de BKV após o transplante renal varia, dependendo do estudo, entre 1 e 10%, e a incidência de perda de enxerto devido a BKV varia desde valores baixos

como 10% até mais de 80% nos pacientes com infecção clinicamente significativa por BKV.² Uma rápida e sensível detecção de infecção por BKV, seja na urina ou plasma, pode levar ao tratamento precoce, que é crítico para prevenir dano renal irreversível e perda do órgão.

O diagnóstico de nefropatia por BKV requer biópsia do enxerto;³ no entanto, pode ser tarde demais para reverter o dano. Estudos têm demonstrado que as alterações citológicas (células *decoy*) e o DNA de poliomavírus são detectados na

Data de submissão: 20/09/2015.

Data de aprovação: 11/04/2016.

Correspondência para:

Alessandro C. Pasqualotto.
 Molecular Biology Laboratory,
 Av. Independência, nº 155,
 Porto Alegre, RS, Brazil. CEP:
 90035-075.
 E-mail: pasqualotto@ufcspa.
 edu.br

DOI: 10.5935/0101-2800.20160054

urina, várias semanas antes de ocorrerem os danos renais.^{2,4} As células *decoy* podem ser observadas no sedimento urinário como o resultado de células renais e uroteliais infectadas por BKV.⁵ Apesar de ser um exame relativamente barato, a detecção de células *decoy* requer perícia considerável e, mesmo assim, não são específicas para a infecção por BKV.^{6,7} A detecção e quantificação do DNA do BKV podem ser realizadas utilizando-se a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Embora seja comparativamente mais dispendioso, em comparação com a citopatologia da urina, a qPCR do BKV tem o potencial de ser um exame mais sensível, proporcionar melhor linearidade e independência em comparação com a experiência pessoal do examinador na obtenção de resultados precisos.

Nesta revisão sistemática, buscamos estudos que compararam diretamente o desempenho analítico da citopatologia da urina e da qPCR, para prever o diagnóstico de nefropatia associada ao BKV, como comprovado por exame histopatológico.

MATERIAL E MÉTODOS

CRITÉRIO PARA SE CONSIDERAR A INCLUSÃO DE ESTUDOS PARA ESTA REVISÃO

Para a inclusão nesta revisão, selecionamos os estudos envolvendo pacientes que foram submetidos a transplante renal não associado ao recebimento de outros órgãos transplantados.

TIPOS DE ESTUDOS

Incluímos estudos de coorte, prevalência e transversais. Estudos envolvendo 10 ou menos pacientes não foram incluídos.

TIPOS DE PARTICIPANTES

Somente pacientes adultos (≥ 18 anos de idade) transplantados renais foram consideradas para o estudo, independentemente do gênero, raça ou nacionalidade.

TIPOS DE INTERVENÇÕES

Uma vez que biópsia é o exame dito *padrão ouro* para nefropatia por BKV, foram incluídos apenas estudos que compararam as biópsias com citologia urinária e/ou qPCR.

TIPOS DE MEDIDAS DE RESULTADO

A medida de desfecho foi a nefropatia causada por BKV, como foi confirmado por biópsia renal. Informações adicionais como carga viral de BKV no plasma e na urina; presença de células *decoy* na citopatologia urinária; a utilização de coloração com anticorpos SV40 no tecido biopsiado foi investigada e associada ao resultado.

ESTRATÉGIA DE BUSCA

Buscamos artigos no banco de dados eletrônicos PubMed usando a estratégia demonstrada na Tabela 1. A busca foi realizada no dia 14 de fevereiro de 2014, e incluiu todos os documentos encontrados no banco de dados.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Trabalhos que não foram escritos em Inglês e/ou estudos que não foram realizados em seres humanos foram excluídos. Uma vez que este estudo teve como objetivo a comparação de exames de diagnóstico, foram excluídos os artigos de revisão, relatos de casos, estudos envolvendo pacientes com menos de 18 anos de idade, estudos de pacientes submetidos a outros procedimentos de transplante (mesmo quando combinados ao renal), estudos de intervenção medicamentosa, estudos em que não foram feitas biópsias para confirmar a nefropatia e estudos que não compararam biópsias com, pelo menos, um dos exames em estudo. Foram feitas tentativas de contato com os autores correspondentes quando os artigos não estavam disponíveis no Pubmed ou quando foi necessária informação adicional. Nas situações em que a resposta não foi recebida, excluímos os respectivos artigos.

ESTUDOS INCLUIDOS NA REVISÃO E DADOS DE SÍNTESE

O fluxograma na Figura 1 mostra o número total de artigos triados e número de manuscritos que preencheram os critérios de inclusão. Dados adicionais foram extraídos a partir destes estudos.

ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Conselho de Revisão Institucional (números de protocolo 3531/11 e 915/12).

TABELA 1 ESTRATÉGIA DE BUSCA UTILIZADA NO ESTUDO (PubMed)

(humanos)

E

(((transplante) OU (sobrevida do enxerto [mh]) OU ("sobrevida do enxerto") OU (rejeição do enxerto [mh]) OU ("rejeição do enxerto"))

E

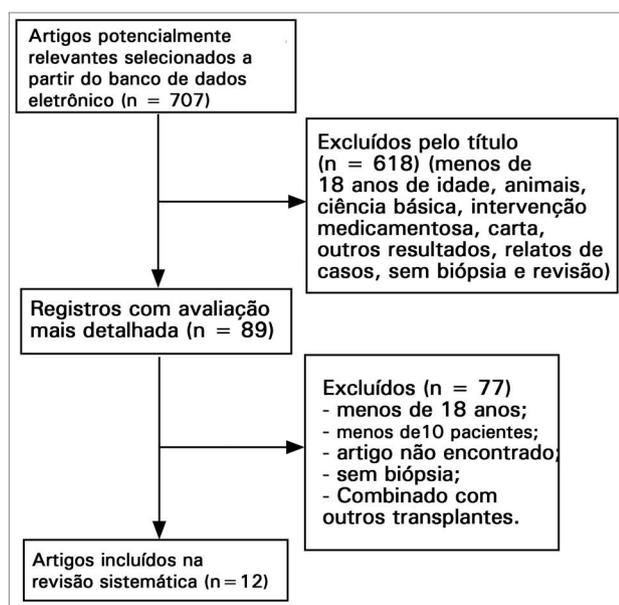
((rim[mh]) Ou (rim) OR ("perda de aloenxerto") OU (doença renal [mh]) OU ("doença renal"))

E

((técnicas moleculares de diagnóstico [mh]) OU ("técnicas moleculares de diagnóstico") OU (biologia molecular [mh]) OU ("biologia molecular") OU ("biologia molecular") OU (PCR) OU ("reação em cadeia da polimerase") OU ("reação em cadeia da polimerase") OU (reação em cadeia da polimerase[mh]) OU (técnicas citológicas[mh]) OU ("técnicas citológicas") OU ("células decoy") OU (papanicolaou) OU (biópsia) OU (viremia) OU (viruria) OU ("carga viral"))

E

(("vírusBK") OU (infecção poliomavirus [mh]) OU ("infecção poliomavirus") OU (poliomavirus) OU ("nefropatia por BK"))

Figura 1. Fluxograma de artigos triados.

RESULTADOS

A busca sistemática inicialmente identificou 707 potenciais artigos. No entanto, somente um total de 12 artigos foram incluídos nas análises finais. Um total de 1.694 pacientes transplantados renais foram incluídos nesta revisão (Tabela 2). Usando biópsia como padrão ouro, houve 115 casos (6,8%) de possível nefropatia sem observação do BKV, e 57 casos (3,4%) de nefropatia associada ao poliomavírus (PVAN). O intervalo de sensibilidade, especificidade, VPP (valor preditivo positivo (VPP)) e PVN (valor preditivo negativo (VPN)) usando a qPCR como teste não-invasivo para detectar e prever PVAN no plasma foi de 60-100%; 33-100% ; 7-65% e 72-100%, respectivamente (Tabela 3). O intervalo de carga viral sérica à época

do diagnóstico foi de 2,7-7 log. O limiar de ≥ 3.7 log para PVAN teve especificidade de 91% e valor previsto positivo (VPP), de 29%, enquanto que $> 4,2$ log aumentou a especificidade para 96% e VPP para 50%. Sensibilidade e VPN foram de 100% em ambos os casos.⁸ Naqueles estudos nos quais foram realizados testes de citologia (n = 506 pacientes), as células *decoy* foram encontradas em 30,6% (n = 155) dos pacientes. Na comparação com a qPCR, as células *decoy* apresentaram melhor intervalo de VPN (97-100%), enquanto a sensibilidade, especificidade e VPP foram reduzidos (Tabela 4). Em um estudo, a replicação do BKV indicado pela presença de células *decoy* na urina, viremia BKV (qPCR), e PVAN (histopatologia) ocorreram em 29%, 13% e 6%, respectivamente; e a mediana do tempo para a detecção foi de 3,7 meses, 5,4 meses e 6,5 meses após o transplante, respectivamente.² Em todos os estudos, o intervalo de tempo para a detecção de viruria, células *decoy* e viremia foram de 0,03-12 meses; 0,5-16,1 meses e 0,9-25 meses após o transplante, respectivamente. A detecção precoce (dia 5) de viruria por BKV pode ser capaz de prever a ocorrência de viremia por BKV e nefropatia.⁹ Além disso, foi demonstrado que a presença de duas ou mais amostras de urina positivas consecutivamente representa uma ferramenta útil para prever viremia por BKV (sensibilidade de 100%; especificidade de 94%; valores preditivos positivos e negativos de 50% e 100%, respectivamente).¹⁰ Foi demonstrado que 20% dos pacientes se tornaram virêmicos quando cópias de BKV na urina chegaram a 7 log/ml - uma percentagem que aumentou para 33%, 50% e 100% a 8 log, 9 log e log ≥ 10 , respectivamente.¹¹ Tal associação não foi demonstrada para células *decoy*.

TABELA 2 ESTUDOS PROSPECTIVOS QUE COMPARARAM A qPCR, CITOLOGIA URINÁRIA E A BIÓPSIA RENAL NO DIAGNÓSTICO DE PVAN NOS RECEPTORES DE TRANSPLANTE DE RIM

Autor	n	Células decoy ^a	Viremia (n)	Carga Viral (plasma)	Suspeita de PVAN(n) ^b	PVAN + (n)
Hirsch <i>et al.</i> ²	78	23	10	4,4 - 7 log	5	5
Pang <i>et al.</i> ¹¹	183	NA	44	Mediana 2,84 (0-5,86)	0	8
Thambo <i>et al.</i> ²⁸	97	15	4	3,3 - 5,4 log	7	3
Viscount <i>et al.</i> ⁸	204	26	16	> 3,7 log	12	4
Almerás <i>et al.</i> ²⁴	123	NA	13	2,7 - 5,6 log	11	3
Babel <i>et al.</i> ¹⁰	233	NA	16	Média 5,9 (intervalo 4,3-7,5) ^c	10	6
Helanterä <i>et al.</i> ²²	68	NA	0	NA	5	0
Girmanova <i>et al.</i> ²⁹	120	NA	6	> 4,5 log	3	3
Pollara <i>et al.</i> ¹⁶	75	39	26	2,8 - 6,5 log	19	7
Saundh <i>et al.</i> ⁹	112	NA	12	Média 5,5 log (intervalo, 3,6 - 6,5)	10	2
Knight <i>et al.</i> ²¹	349	NA	57	5,7 log (DP ± 5,9)	17	15
Menter <i>et al.</i> ²³	52	52	17	> 7 log	16	1

^a número de pacientes diagnosticados com células decoy à citopatologia; ^b Número de pacientes com diagnóstico de nefropatia mas sem visualização de BKV por SV40 ou características de alterações virais; ^c média de pico de carga viral; NA: Não aplicável; PVAN: nefropatia associada a Polyomavirus; DP: desvio-padrão.

TABELA 3 DESEMPENHO DA VIREMIA POR BKV DETECTADA PELA qPCR NA PREDIÇÃO DE PVAN

Autor	Alvo molecular	Primer ou probe	Sequência (5'-3')	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
Hirsch <i>et al.</i> ²	NI	Primer 1,	AGCAGGCAAGGG TTCTACTACTAAAT	100	88	50	100
		Primer 2,	GAAGCAACAGCA GATTCTCAACA				
Pang <i>et al.</i> ¹¹	VP1 gene	BKpangF	ATGTGACCA ACACAGC	60	76	65	72
		BKpangP1	AGGAGAACCCAGA GAGTGGA-fluoresceína				
Thambo <i>et al.</i> ²⁸	VP1 gene	BKpangP2	LC-Red 640-GGCAGCCTATGT ATGGTATGGAA-fosfato (5'-AGG TAG AAG AGG TTA GGG TGT TTG ATG GCA CAG-3')	67	33	20	80
		NI	marcação dupla na extremidade 5' com 6-carboxyfluoresceína (FAM) e a extremidade 3' com 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA)				
Viscount <i>et al.</i> ⁸	VP2 gene	Primer PoL1s,	CACTTTTGGGGACCTAGT	100	96	50	100
		Primer PoL2as,	CTCTACAGTAGCA AGGGATGC				
		Probe 1, PoLP1,	TCTGAGGCTGCTGCT GCCACAGGATTTT-fluoresceína				
		Probe 2, PoLP2,	LC-Red 640-AGTAG CTGAAATTGCTG CTGGAGAGGCTGCT-fosfato				

CONTINUAÇÃO TABELA 3.

Almerás <i>et al.</i> ²⁴	Gene VP2	Primer PoL1s,	CACTTTTGGGGGACCTAGT	100	91	15	100
		Primer PoL2as,	CTCTACAGTAGCAAGGGATGC				
		Sonda 1, PoLP1, ,	TCTGAGGCTGC TGCTGCCA CAGGATTTT-fluoresceína				
		Sonda 2, PoLP2,	LC-Red 640-AGTAGCTG AAATTGCTGC TGGAGAGGCTGCT- fosfato				
Babel <i>et al.</i> ¹⁰	VP1 gene	NI	NI	100	96	43	100
Girmanova <i>et al.</i> ²⁹	Gene que codifica T Ag grande	Kit comercial	BKV Q-PCR Kit de alerta de detecção (Chemagen)	100	68	7	100
Pollara <i>et al.</i> ¹⁶	Gene que codifica T Ag grande	Kit comercial	BKV Q. Kit alerta (Nanogen Advanced Diagnostics, Itália)	95	100	NI	NI
Saundh <i>et al.</i> ⁹	Gene que codifica T Ag grande	BKV para frente	TGA CTA AGA AAC TGG TGT AGA TCA	100	91	17	100
		BKV para trás	YTCC TT TAAT GA AAA ATG GGA				
		BKV Sonda	FAM AGT GTT GAG AAT CTG CTG TTG CTT C BHQ-1				
Knight <i>et al.</i> ²¹	NI	NI	NI	100	87	26	100
Menter <i>et al.</i> ²³	NI	Primer 1,	AGCAGGCAAGGGTTCTATTACTAAAT	100	57	41	100
		Primer 2,	GAAGCAACAGCAGATTCTCAACA				
		Sonda	AAGACCCTAAAGACTTTCCCTCTGAT CTACACCAGTTT marcado com 6-carboxifluoresceína na extremidade 6'-carboxitetrametilrodamina na extremidade 3'				

Ag: Antígeno; BKV: BK vírus; NI: Não informado; VPV: Valor Preditivo Positivo; VPP: Valor Preditivo Positivo PVAN: nefropatia associada à poliomavírus.

TABELA 4 DESEMPENHO DA CITOPATOLOGIA URINÁRIA NA PREDIÇÃO DA PVAN

Autor	Célula Decoy (n)	PVAN (n)	Sensibilidade	Especificidade	PPV	NPV
Hirsch <i>et al.</i> ²	23	5	100	71	29	100
Thamboo <i>et al.</i> ²⁸	15	3	67	85	20	98
Viscount <i>et al.</i> ⁸	26	4	25	85	5	97
Pollara <i>et al.</i> ¹⁶	39	7	100	53	18	100

VPV: valor preditivo negativo; VPV: valor preditivo positivo; PVAN: nefropatia associada ao poliomavírus.

DISCUSSÃO

Este estudo mostra a escassez de dados na literatura sobre a comparação do desempenho da qPCR (sangue ou urina) e citopatologia urinária para o diagnóstico de PVAN. Parece claro que a virúria (definida como detecção de DNA de BKV na urina) precede a detecção de células *decoy* na citologia urinária, que antecede viremia e PVAN.² A detecção de células

decoy e virúria BKV são importantes marcadores de replicação de BKV, mas pobres preditores de PVAN.

O ponto de corte para determinar a relevância clínica da viremia por BKV permanece controverso. A Sociedade Americana de Transplante (AST) recomenda que, na presença de cargas plasmáticas > 4 log por três ou mais semanas, deve-se presumir um diagnóstico de PVAN e considerar uma biópsia para se chegar ao diagnóstico definitivo.¹² Enquanto a

Sociedade Americana de Transplante e o Grupo para Melhorias Globais no Desfecho de Doenças Renais (KDIGO) sugerem uma carga viral de BK de 4 log de cópias (10.000 cópias) como um valor de corte para PVAN. Não há métodos padronizados ou aprovados pela agência reguladora norte-americana, FDA, para avaliação da carga viral BK. O diagnóstico de BKV está atualmente baseado em diferentes abordagens usando a qPCR, mas uma vez que não existe um método padrão para avaliação da carga viral de BKV, é essencial que as instituições implementem estudos de validação clínica, certificando suas próprias metodologias a serem usadas como um guia para tratamento clínico.^{2,13-19}

O diagnóstico definitivo de PVAN é feito pela histopatologia,²⁰ em um contexto em que a infecção viral pode ser difícil de diferenciar a partir da rejeição de órgãos. Na nossa análise, apenas quatro artigos relataram o uso da coloração de SV40 no exame histopatológico.²¹⁻²⁴ Portanto, a ausência de um exame de confirmação pode subestimar a real frequência da PVAN. O SV40 deve ser usado quando há suspeita clínica de infecção por BKV, apesar da ausência de alterações visíveis no tecido examinado.²⁵ A AST recomenda um mínimo de duas biópsias de fragmento, preferencialmente com tecido medular, com a intenção de reduzir o diagnóstico falso negativo de PVAN, que pode ser tão elevada quanto 20-30% (12, 26). Portanto, uma biópsia negativa não descarta a presença de PVAN.²⁶

CONCLUSÃO

Este estudo demonstra a escassez de dados na literatura sobre a comparação de exames diagnósticos para a predição de PVAN. A qPCR tem um melhor desempenho diagnóstico global do que a citopatologia urinária para a detecção de PVAN. No entanto, o ponto de corte para exames de qPCR permanecem pouco definidos. Em contraste com o citomegalovírus (CMV), para o qual a Organização Mundial de Saúde produziu padrões internacionais,²⁷ existe uma necessidade de padronização dos exames relacionados ao BKV. Em última análise, são necessários estudos prospectivos adicionais, a fim de elucidar o ponto de corte ideal para a carga viral no plasma e na urina, para o diagnóstico precoce de PVAN, bem como o momento de ocorrência da viremia, e cofatores associados ao receptor do transplante.

AGRADECIMENTOS

As diferentes técnicas limitam a comparação entre os ensaios de qPCR incluídos, uma vez que não existe um padrão internacional para a quantificação de BKV.

Financiamento: Este estudo foi financiado pela FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul), uma agência governamental brasileira de apoio à pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Hume DM, Merrill JP, Miller BF, Thorn GW. Experiences with renal homotransplantation in the human: report of nine cases. *J Clin Invest* 1955;34:327-82. DOI: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI103085>
- Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ, et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 2002;347:488-96. PMID: 12181403 DOI: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa020439>
- Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, Ginevri F, Gordon J, Limaye AP, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation* 2005;79:1277-86. PMID: 15912088 DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/01.TP.0000156165.83160.09>
- Brennan DC, Agha I, Bohl DL, Schnitzler MA, Hardinger KL, Lockwood M, et al. Incidence of BK with tacrolimus *versus* cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *Am J Transplant* 2005;5:582-94. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00742.x>
- Poloni JA, Pinto GG, Pasqualotto AC, Rotta LN. Decoy cells due to polyomavirus BK infection in the urine sediment of a patient with lupus nephritis. *Lupus* 2013;22:1547-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/0961203313504635>
- Kahan AV, Coleman DV, Koss LG. Activation of human polyomavirus infection-detection by cytologic technics. *Am J Clin Pathol* 1980;74:326-32. PMID: 6251715 DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ajcp/74.3.326>
- Traystman MD, Gupta PK, Shah KV, Reissig M, Cowles LT, Hillis WD, et al. Identification of viruses in the urine of renal transplant recipients by cytomorphology. *Acta Cytol* 1980;24:501-10.
- Viscount HB, Eid AJ, Espy MJ, Griffin MD, Thomsen KM, Harmsen WS, Razonable RR, et al. Polyomavirus polymerase chain reaction as a surrogate marker of polyomavirus-associated nephropathy. *Transplantation* 2007;84:340-5. PMID: 17700158 DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/01.tp.0000275205.41078.51>
- Saundh BK, Baker R, Harris M, Welberry Smith MP, Cherukuri A, Hale A. Early BK polyomavirus (BKV) reactivation in donor kidney is a risk factor for development of BKV-associated nephropathy. *J Infect Dis* 2013;207:137-41. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jis642>
- Babel N, Fendt J, Karaivanov S, Bold G, Arnold S, Seifried A, et al. Sustained BK viremia as an early marker for the development of BKV-associated nephropathy: analysis of 4128 urine and serum samples. *Transplantation* 2009;88:89-95. PMID: 19584686 DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/TP.0b013e3181aa8f62>
- Pang XL, Doucette K, LeBlanc B, Cockfield SM, Preiksaitis JK. Monitoring of polyomavirus BK virus viremia and viremia in renal allograft recipients by use of a quantitative real-time PCR assay: one-year prospective study. *J Clin Microbiol* 2007;45:3568-73. PMID: 17855578 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00655-07>

12. Hirsch HH, Randhawa P; AST Infectious Diseases Community of Practice. BK virus in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009;S136-46. PMID: 20070673 DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02904.x>
13. Randhawa P, Kant J, Shapiro R, Tan H, Basu A, Luo C. Impact of genomic sequence variability on quantitative PCR assays for diagnosis of polyomavirus BK infection. *J Clin Microbiol* 2011;49:4072-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01230-11>
14. Hirsch HH, Drachenberg CB, Steiger J, Ramos E. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: critical issues of screening and management. *Adv Exp Med Biol* 2006;577:160-73. PMID: 16626034
15. Bechert CJ, Schnadig VJ, Payne DA, Dong J. Monitoring of BK viral load in renal allograft recipients by real-time PCR assays. *Am J Clin Pathol* 2010;133:242-50. PMID: 20093233 DOI: <http://dx.doi.org/10.1309/AJCP63VDFCKCRUUL>
16. Pollara CP, Corbellini S, Chiappini S, Sandrini S, De Tomasi D, Bonfanti C, et al. Quantitative viral load measurement for BKV infection in renal transplant recipients as a predictive tool for BKVAN. *New Microbiol* 2011;34:165-71.
17. Hassan S, Mittal C, Amer S, Khalid F, Patel A, Delbusto R, et al. Currently recommended BK virus (BKV) plasma viral load cutoff of $\geq 4 \log_{10}/\text{mL}$ underestimates the diagnosis of BKV-associated nephropathy: a single transplant center experience. *Transpl Infect Dis* 2014;16:55-60. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/tid.12164>
18. Kudose S, Dong J. Clinical validation study of quantitative real-time PCR assay for detection and monitoring of BK virus nephropathy. *Ann Clin Lab Sci* 2014;44:455-60. PMID: 25361932
19. Mitui M, Leos NK, Lacey D, Doern C, Rogers BB, Park JY. Development and validation of a quantitative real time PCR assay for BK virus. *Mol Cell Probes* 2013;27:230-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2013.08.001>
20. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008;8:753-60. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2008.02159.x>
21. Knight RJ, Gaber LW, Patel SJ, DeVos JM, Moore LW, Gaber AO. Screening for BK viremia reduces but does not eliminate the risk of BK nephropathy: a single-center retrospective analysis. *Transplantation* 2013;95:949-54. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/TP.0b013e31828423cd>
22. Helanterä I, Ortiz F, Auvinen E, Räisänen-Sokolowski A, Lappalainen M, Lautenschlager I, et al. Polyomavirus BK and JC infections in well matched Finnish kidney transplant recipients. *Transpl Int* 2009;22:688-93. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-2277.2009.00847.x>
23. Menter T, Mayr M, Schaub S, Mihatsch MJ, Hirsch HH, Hopfer H. Pathology of resolving polyomavirus-associated nephropathy. *Am J Transplant* 2013;13:1474-83. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/ajt.12218>
24. Alméras C, Foulongne V, Garrigue V, Szwarc I, Vetromile F, Segondy M, et al. Does reduction in immunosuppression in viremic patients prevent BK virus nephropathy in de novo renal transplant recipients? A prospective study. *Transplantation* 2008;85:1099-104. PMID: 18431228 DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/TP.0b013e31816a33d4>
25. Bohl DL, Brennan DC. BK virus nephropathy and kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2:S36-46. DOI: <http://dx.doi.org/10.2215/CJN.00920207>
26. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hirsch HH, Wali R, Crowder C, Nogueira J, et al. Histological patterns of polyomavirus nephropathy: correlation with graft outcome and viral load. *Am J Transplant* 2004;4:2082-92. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1600-6143.2004.00603.x>
27. NIBSC/Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency/World Health Organization. WHO International Standard - 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus for Nucleic Acid Amplification Techniques - NIBSC code: 09/162 - Instructions for use (Version 6.0, Dated 09/10/2014). [Cited 2014 Nov 11]. Available from: <https://www.nibsc.org/documents/ifu/09-162.pdf>
28. Thamboo TP, Jeffery KJ, Friend PJ, Turner GD, Roberts IS. Urine cytology screening for polyoma virus infection following renal transplantation: the Oxford experience. *J Clin Pathol* 2007;60:927-30. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2006.042507>
29. Girmanova E, Brabcova I, Bandur S, Hribova P, Skibova J, Viklicky O. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 120 Czech renal transplant recipients. *J Med Virol* 2011;83:1395-400. PMID: 21618550 DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.22106>