



Virus BK en injertos renales: evidencia histológica de la infección

L. F. Arias, T. Álvarez*, L. González*, J. Sanz*, A. Sánchez-Fructuoso**, M. Marqués**, D. Prats**, M. Saiz-Pardo*, M. C. Sáez, S. Hernández***, A. Barrientos** y J. Blanco*

Departamentos de *Anatomía Patológica y **Nefrología. Hospital Clínico San Carlos.

***Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. Madrid.

RESUMEN

Introducción: La nefritis intersticial (NI) asociada al virus BK (VBK) es una complicación del trasplante renal. Su verdadera incidencia es controvertida. El objetivo de nuestro trabajo es determinar la incidencia de inclusiones nucleares de VBK en los especímenes de tejido renal de pacientes trasplantados en un único centro hospitalario.

Materiales y métodos: Todos los especímenes de riñones trasplantados ($n = 838$) fueron evaluados por microscopía óptica. Utilizamos la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), específica para ADN del VBK, en 41 poblaciones celulares obtenidas por microdissección, provenientes de casos con inclusiones características de este virus, casos con otros cambios nucleares y casos sin cambios citológicos.

Resultados: Identificamos inclusiones de poliomavirus en 6 casos (5 con NI y uno con inclusiones sólo uroteliales). En uno de los casos con NI el ADN estaba degradado. Por PCR confirmamos la infección por VBK en los otros 5. Ninguno de los casos sin inclusiones fue positivo para ADN del virus.

Conclusiones: Las inclusiones nucleares pueden adoptar cinco formas que parecen ser características de la infección en riñón. La PCR tiene una alta especificidad para la infección por VBK y usualmente no detecta la infección latente.

Palabras clave: **Inclusiones nucleares. Nefritis intersticial. Poliomavirus. Trasplante renal. Virus BK.**

BK VIRUS IN KIDNEY ALLOGRAFTS: A SEARCH FOR HISTOLOGIC EVIDENCE OF THE INFECTION

SUMMARY

Background. BK virus (BKV) associated interstitial nephritis is a complication in renal transplantation recipients. Its incidence is controversial. The aim of the pre-

Recibido: 28-XI-2003.

En versión definitiva: 16-IV-2004.

Aceptado: 19-IV-2004.

Correspondencia: Dra. Julia Blanco
Departamento de Anatomía Patológica
Hospital Clínico San Carlos
C/ Martín Lagos, s/n
28040 Madrid
E-mail: mblanco.hcsc@salud.madrid.org

El trabajo de Luis F. Arias es financiado por la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

sent study is to determine the incidence of histopathologic evidence of BKV-infection in a single centre.

Materials and methods. Renal allograft tissue samples ($n = 838$) from 526 patients undergoing renal transplant were evaluated by light microscopy. Polymerase chain reaction (PCR) assay for BKV DNA was performed in 41 microdissected cell populations from cases with viral inclusions, cases with other nuclear changes, and cases without nuclear changes.

Results. Polyomavirus-inclusions were identified in six cases (five with interstitial nephritis and other one with only urothelial infection). In one case with interstitial nephritis the DNA was degraded. PCR confirmed BKV infection in the other five and was negative in cases without inclusions.

Conclusions. Five patterns of inclusions bodies are observed and they appear to be characteristic. PCR assay seemingly have a high specificity for BKV detection and it does not usually detect latent viral infection.

Key words: **Polyomavirus. BK virus. Kidney transplant, allograft. Nuclear inclusions. Interstitial nephritis.**

INTRODUCCIÓN

Han sido identificadas tres especies de poliovirus (PV) que infectan al hombre: virus JC (VJC), virus BK (VBK) y el virus simio SV40. La infección por el VBK ha sido asociada principalmente con alteraciones patológicas en el tracto urinario¹⁻³. Se cree que la infección se adquiere en la niñez a través de la vía respiratoria y también ha sido demostrada la transmisión vertical (transplacentaria)⁴. Parece que los riñones son el principal sitio de latencia en el hombre⁵. En receptores de injertos renales se detectan anticuerpos contra el VBK entre el 55% y el 73% de los casos en el momento del trasplante^{6,7}. La reactivación ocurre cuando disminuye la inmunidad celular, pero otras alteraciones, como la isquemia del injerto, aparentemente juegan un papel importante en la reactivación¹. Hemos revisado todas las biopsias de riñones trasplantados en nuestro centro en un período de 19 años. La demostración del PV en el tejido renal es necesaria para confirmar, con certeza, la nefritis intersticial (NI) asociada al PV⁸; por ello, iniciamos nuestro trabajo buscando las alteraciones histológicas características de la enfermedad. Para confirmar la infección usamos la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cualitativa, específica para VBK. Nuestro objetivo es determinar la incidencia de inclusiones del VBK en especímenes de injertos renales en nuestro centro.

MATERIAL Y MÉTODOS

Revisamos, retrospectivamente, 838 especímenes consecutivos provenientes de riñones trasplantados

(biopsias o nefrectomías) obtenidos en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (HCSC) entre enero de 1984 y septiembre de 2003. Todos los cortes histológicos fueron revisados por microscopía óptica para buscar inclusiones nucleares sugerentes de infección por PV. Los especímenes provenían de 526 receptores, estas muestras fueron obtenidas entre un día y 12 años post-trasplante. Cada paciente tenía entre 1 y 8 biopsias. En todos los casos en que identificamos inclusiones sugerentes de infección por PV realizamos PCR ($n = 6$). También hicimos PCR en otros 25 casos correspondientes a tres grupos así: 1) cinco casos en los que identificamos células tubulares con cambios nucleares no característicos de inclusión por PV, pero, con algunas similitudes (cromatina clara con aspecto en vidrio esmerilado, cambios vesiculares o núcleos grandes con cromatina gruesa e irregular desplazada o acentuada en la periferia del núcleo), 2) diez casos de injertos renales sin cambios sugerentes de inclusiones virales, explantados por rechazo agudo, nefropatía crónica/esclerosante del injerto o trombosis de vasos renales, elegidos aleatoriamente; y 3) diez casos provenientes de nefrectomías de pacientes no trasplantados y sin inmunosupresión (nefrectomías realizadas debido a carcinomas, nefropatía obstructiva y displasia renal).

Para la extracción del ADN preparamos cortes del tejido a partir del bloque incluido en parafina (4 a 6 micras de espesor). Estos cortes fueron obtenidos de la misma manera como se hacen los cortes histológicos habituales. Luego de desparafinar, hicimos una tinción con H & E de manera convencional, sin pasar por xilol porque éste puede alterar las propiedades del ADN. En todos los casos de nefrectomía realizamos microdissección del tejido con la punta de una aguja (manual) para seleccionar las

áreas con inclusiones o cambios nucleares, zonas de la unión corticomedular (donde la NI asociada al VBK es más frecuentemente encontrada) y urotelio. En total fueron 41 secciones para PCR provenientes de los 31 casos: 24 nefrectomías y 7 cilindros de biopsias con aguja. La extracción del ADN fue llevada a cabo por digestión con proteinasa K. La secuencia del ADN del VBK fue identificada como ha sido descrito previamente⁹. Amplificamos el ADN por PCR con primeros específicos para la región inicial del PV. Los primeros externos: 5'AAGTCTT-TAGGGTCTTCTAC3' y 5'GTGCCAACCTATGGAA-CAGA3' amplifican un fragmento de 176 pares de bases, común a los virus JC y BK. El par de primeros internos combina un primer común: 5'AAGTCTTTAGGGTCTTCTAC3' con el específico para VBK: 5'GAGTCCTGGTGGAGTTCC3' para obtener un fragmento de ADN del VBK de 149 pares de bases. La PCR fue realizada en 30 ciclos de 90 °C por 30 segundos, 50 °C por 45 segundos y 72 °C por 60 segundos, seguidos por un paso de extensión final de 10 minutos a 72 °C. El producto de la amplificación del ácido nucleico fue sometido a electroforesis en agarosa al 4% y visualizado por tinción con bromuro de etidio. Usamos como control positivo una muestra de biopsia renal debidamente confirmada como infección por VBK. Incluimos controles negativos.

RESULTADOS

Identificamos seis casos con inclusiones características de PV (0,7% de especímenes y 1,1% de receptores con estudio histológico). El número total de trasplantados renales en el mismo período de tiempo fue de 995.

Características histopatológicas

Las inclusiones virales están presentes en las células de túbulos proximales y distales en cuatro casos, en células tubulares y en el epitelio urotelial en un caso y sólo en el urotelio en el caso restante, por lo cual, el diagnóstico de nefritis intersticial fue confirmado en cinco casos (0,6% de especímenes de injertos renales y 1% de los pacientes trasplantados que tienen estudio histológico). Las inclusiones son exclusivamente intranucleares y de cinco tipos morfológicos diferentes: 1) núcleos claros con aspecto finamente granular y apariencia en «vidrio esmerilado», con desplazamiento de la cromatina a la periferia del núcleo (fig. 1a); 2) una inclusión basófila o anfófila bien definida de material homogé-

neo («inclusión sólida») (fig. 1b); 3) una inclusión eosinófila central rodeada por un estrecho halo claro (fig. 1c); 4) una masa central irregular, rodeada por un espacio claro o vacío que la separa del anillo de cromatina periférica, algo parecidas a las inclusiones tipo Cowdry A (fig. 1d); 5) típicas inclusiones tipo Cowdry A (fig. 1e). Las inclusiones de los tipos 1 y 2 se identifican en el urotelio y/o túbulos en todos los seis casos, las de tipo 3 y 4 se ven sólo en el urotelio en los casos 3 y 4, y las inclusiones de tipo 5 se identifican sólo en células tubulares del caso 1. Las células infectadas contienen sólo un cuerpo de inclusión y están, a menudo, aumentadas de tamaño.

En los casos con infección tubular hay células necróticas descamadas en su luz, denudación de la membrana basal, cilindros celulares y granulares, y grados variables de inflamación intersticial, con células plasmáticas y tubulitis. Las inclusiones en el urotelio se localizan predominantemente en las capas superficiales, con linfocitos y escasos eosinófilos en las zonas adyacentes. En las muestras de biopsia con aguja, las células con inclusiones corresponden, aproximadamente, al 10-20% de células tubulares. En los especímenes de nefrectomía, las inclusiones se localizan principalmente en la corteza profunda y médula externa, con extensas áreas no comprometidas. En los seis casos la inmunotinción para citomegalovirus fue negativa.

El ADN de una de las muestras con inclusiones (caso 2) estaba degradado y no fue posible confirmar la infección con PCR. Los otros cinco especímenes con inclusiones típicas de PV revelaron bandas amplificadas correspondientes al ADN del VBK. En el caso 4 el ADN del virus fue identificado sólo en el urotelio y no fue detectado en el tejido renal con o sin enfermedad linfoproliferativa. Todos los otros 25 casos estudiados con PCR (32 poblaciones celulares) fueron negativos para ADN del VBK.

Características clínicas

Caso 1

Hombre de 43 años de edad con insuficiencia renal crónica (IRC) secundaria a síndrome hemolítico urémico. Trasplante renal de cadáver. Terapia con tacrolimus (tac), micofenolato mofetil (MMF) y prednisona (PD). Creatinina basal post-trasplante: 1,2 mg/dL. No ha recibido tratamiento anti células T. A los 11 meses del trasplante aumento de la creatinina sérica (CrS) hasta 3,4 mg/dL; se hace biopsia renal y se documenta la infección. Se optó por probar un cambio en el tratamiento: tacrolimus por ciclosporina

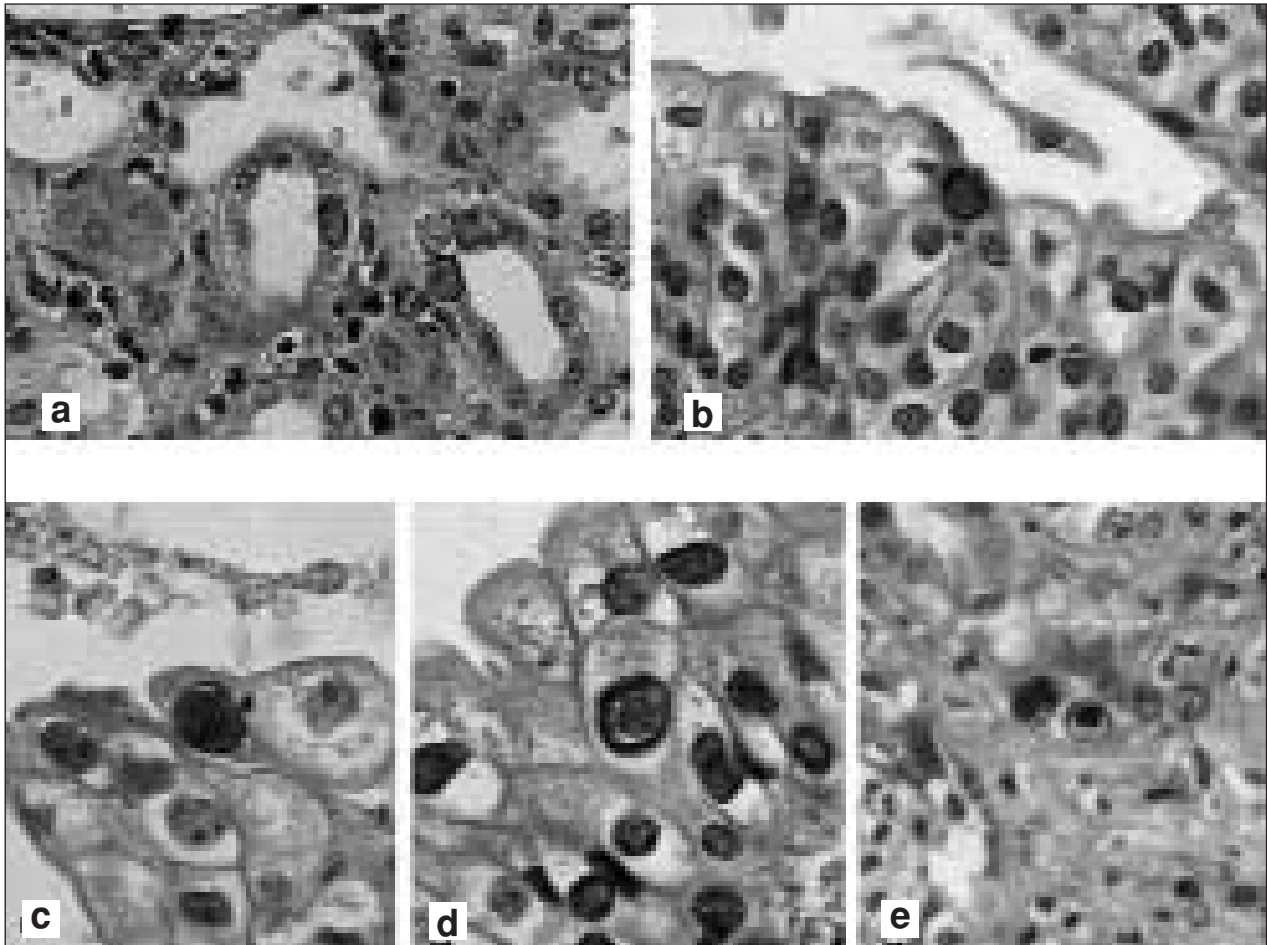


Fig. 1.—**a.** Inclusión con aspecto en «vidrio esmerilado»; el intersticio muestra infiltrado linfo-plasmocitario (hematoxilina-eosina, aumento original: x250). **b.** Inclusiones nucleares anfófilas, con aspecto «gelatinoso» en capas superficiales del urotelio (hematoxilina-eosina, aumento original: x250). **c.** Urotelio: una inclusión gelatinosa con un estrecho halo claro, bien definido, separando el cuerpo de inclusión del anillo periférico de cromatina (hematoxilina-eosina, aumento original: x400). **d.** Urotelio: la cromatina está desplazada a la periferia por una masa irregular central, rodeada por un halo claro (hematoxilina-eosina, aumento original: x400). **e.** Inclusión nuclear tipo Cowdry A en una célula tubular (hematoxilina-eosina, aumento original: x400).

na (CsA); la CrS se estabilizó en 3,2 mg/dL ocho meses después del diagnóstico de NI asociada al VBK.

Caso 2

Hombre de 57 años, IRC de etiología no filiada. Trasplante renal de donante en muerte cerebral. Tratamiento con CsA-azatioprina-PD. CrS basal post-trasplante: 1,6 mg/dL. Tres meses post-trasplante presenta elevación de la CrS hasta 2,5 mg/dL que no responde a bolos de esteroides por lo que se hace biopsia. Se evidencia la infección además de toxicidad aguda por CsA y glomerulonefritis postinfecciosa. El paciente no recibió tratamiento anti célu-

las T. Después de la biopsia, y sin tratamiento adicional a los esteroides, la creatinina desciende hasta 1,9 mg/dL. El paciente continuó con el mismo tratamiento y la función del injerto ha permanecido estable cuatro años después del diagnóstico de la infección, con CrS de 2,0 mg/dL.

Caso 3

Hombre de 58 años con IRC por glomerulopatía IgA. Trasplante renal de donante en muerte cerebral. Tratamiento con CsA-MMF-PD. CrS post-trasplante: 1,8 mg/dL. 75 días después del injerto ingresa por deterioro respiratorio debido a infección por citomegalovirus y requiere ventilación mecánica. El pacien-

te presenta anuria y reinicia hemodiálisis. Ciento diez días después del implante se explora quirúrgicamente el injerto evidenciándose un aspecto isquémico por lo que se explanta (en este espécimen se documenta la infección por VBK y nefropatía crónica/esclerosante del injerto grado IIIb según la clasificación de Banff). Se retira inmunosupresión y el paciente mejora. No recibió tratamiento anti-células T.

Caso 4

Mujer de 57 años con IRC de origen no filiado. Recibe injerto renal de donante en muerte cerebral. Tratamiento con CsA-azatioprina-PD. Buena evolución inicial, CrS: 1,7 mg/dL. Un mes después del injerto presenta episodio de rechazo agudo y recibe tratamiento con globulina antitimocítica, con buena respuesta. Tres meses después del trasplante presenta deterioro rápido de la función renal, CrS: 4,6 mg/dL. Por biopsia se documenta enfermedad linfoproliferativa post-trasplante (ELPT) en el riñón implantado. Se hace nefrectomía del injerto y se suspende inmunosupresión. En esta nefrectomía se encuentra, además de la ELPT, infección por el VBK. Dos meses más tarde la paciente muere por la diseminación sistémica de la neoplasia linfoide.

Caso 5

Mujer de 27 años con IRC por Síndrome de Alport. Un primer trasplante renal se pierde a los tres años por rechazo crónico. Recibe un segundo trasplante de cadáver. Tratamiento con tac-MMF-PD. Once días después presenta rechazo agudo tratado con OKT3. La CrS se estabiliza en 1,3 mg/dL. Nueve meses post-trasplante presenta aumento de la CrS: 3,0 mg/dL. Se toma biopsia en la que se evidencian las inclusiones virales. Se reduce la inmunosupresión y se cambia el tacrolimus por rapamicina, pero presenta trombopenia y se cambia por CsA. Recibe además cidofovir. La CrS se ha estabilizado en 2,5 mg/dL cuatro meses después del diagnóstico de la infección.

Caso 6

Mujer de 52 años con IRC de etiología no filia-da. Trasplante renal de cadáver. Tratamiento: tac-MMF-PD. A los 15 días del trasplante presenta rechazo agudo tratado con OKT3. Continúa con buena función: CrS 1,2 mg/dL. 46 meses después del trasplante inicia elevación progresiva de la CrS hasta 3,4 mg/dL. Se hace biopsia en la que se evidencia, además de las inclusiones virales, nefropatía crónica/esclerosante del injerto, grado IIIb según la clasi-

ficación de Banff. Se cambia el tacrolimus por rapamicina y se suministra cidofovir. CrS entre 2,5 y 3,5 mg/dL en los cuatro meses después del diagnóstico. La orina ha continuado mostrando células con inclusiones virales en los casos 1, 5 y 6.

DISCUSIÓN

En los últimos años la nefropatía asociada al VBK ha sido reconocida como una importante causa de disfunción del injerto renal. Su incidencia es variable en diferentes centros, desde menos del 1% hasta el 6,4% de receptores de trasplante renal^{3,10}. El diagnóstico histológico es difícil debido a que las inclusiones no se distribuyen homogéneamente en el tejido renal. La demostración de las células «señuelo» o células «trampa» («decoy cells») por citología de orina tiene baja especificidad¹¹. Entre más de 350 muestras de orina de trasplantados renales en nuestro centro, el 20% muestran inclusiones virales, pero pocos de estos casos tienen nefropatía por el virus. La PCR cuantitativa para detectar ADN del VBK en sangre, parece un método mejor para identificar pacientes con alta probabilidad de tener enfermedad debida al virus¹², sin embargo, el compromiso renal necesita ser confirmado por biopsia⁸. El estudio citológico de orina es importante para descartar NI asociada al virus: si la orina es persistentemente negativa puede descartarse la enfermedad¹³. Nuestro trabajo tiene la seria limitación de ser realizado a partir de biopsias, por tanto, desconocemos el estado real de los receptores sin biopsia. Además, sabemos que la infección afecta áreas focales del órgano, así que en biopsias sin inclusiones no podemos descartar la infección.

Nosotros usamos la PCR para confirmar la infección y encontramos ADN del VBK en los cinco casos con las características inclusiones (El ADN estaba degradado en el otro caso). Se cree que el riñón es el principal sitio de latencia del VBK⁵, aún así, no encontramos ADN del virus en muestras sin inclusiones, lo cual sugiere que es necesaria una cantidad mínima (o un umbral) de ADN para detectarlo. Otros autores han encontrado una baja cantidad de ADN de VBK, por PCR cuantitativa, en muestras de pacientes sin NI asociada al VBK². La PCR específica para el virus es una buena prueba confirmatoria de la infección, pero, la inmunohistoquímica y la microscopía electrónica son pruebas que también pueden confirmarla. Encontrar, en una muestra de injerto renal, uno o varios de los cinco tipos de inclusión nuclear descritos aquí, sugiere fuertemente la infección por PV, pero, el adenovirus puede inducir cambios tubulares similares^{14,15}. Nosotros no

sabemos si estos tipos de inclusión representan diferentes estadios del desarrollo del daño celular, inducido por el virus, o si son la expresión de una diferente carga viral en la célula.

Se ha afirmado que la infección por el VBK es una importante causa de disfunción del injerto^{10,16}, pero aún no está absolutamente probado si las inclusiones virales constituyen un hallazgo incidental o patogénico. La mayoría de infecciones por el VBK en receptores de injertos renales se presentan como una viruria asintomática¹. La presencia de PV en orina puede detectarse en el 10% al 45% de los receptores de trasplante renal^{8,13}. Haririan y cols.¹⁷ demostraron que la reactivación del PV en riñones nativos de pacientes trasplantados de páncreas no es infrecuente y, en estos pacientes, la reactivación viral no está asociada con una alteración significativa en la función renal.

Nuestro trabajo presenta la incidencia de casos de nefropatía asociada a inclusiones del VBK en los especímenes histológicos y no la incidencia de la enfermedad en nuestro grupo de trasplantados. Para conocer exactamente la incidencia en receptores de injertos renales son necesarios estudios prospectivos, con un largo periodo de seguimiento, y estudios serológicos, citológicos de orina e histológicos periódicos¹⁰. El diagnóstico de esta enfermedad es importante porque implica un tratamiento completamente diferente al del rechazo o la nefropatía crónica/esclerosante del injerto. Las opciones terapéuticas son limitadas y la respuesta al manejo no suele ser buena. Se recomienda tratar de reducir, en lo posible, la inmunosupresión y algunos autores han sugerido la utilidad de un antiviral como cidofovir^{18,19}. El poco número de casos en nuestro estudio no permite establecer correlaciones con la inmunosupresión o el contexto clínico.

En resumen, la infección renal por el VBK puede estar asociada a nefritis intersticial o puede detectarse en el urotelio sin evidencia de disfunción renal. Nuestros datos sugieren que la detección de ADN del VBK por PCR tiene alta especificidad y no suele detectar infección latente. Los cinco tipos de inclusión nuclear presentados aquí son muy sugerentes de infección por PV.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mylonakis E, Goes N, Rubin RH, Cosimi AB, Colvin RB, Fishman JA: BK virus in solid organ transplant recipients: An emerging syndrome. *Transplantation* 72: 1587-1592, 2001.
2. Randhawa PS, Vats A, Zygmunt D, Swalsky P, Scantlebury V, Shapiro R, Finkelstein S: Quantitation of viral DNA in renal allograft tissue from patients with BK virus nephropathy. *Transplantation* 74: 485-488, 2002.
3. Randhawa P, Finkelstein S, Scantlebury V, Shapiro R, Vivas C, Jordan M, Picken MM, Demetris AJ: Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation* 67: 103-109, 1999.
4. Pietropaolo V, Di Taranto C, Degener AM, Jin L, Sinibaldi L, Baiocchini A, Melis M, Orsi N: Transplacental transmission of human polyomavirus BK. *J Med Virol* 56: 372-376, 1998.
5. Chesters PM, Heritage J, McCance DJ: Persistence of DNA sequences of BK and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *J Infect Dis* 147: 676-684, 1983.
6. Hogan TF, Borden EC, McBain JA, Padgett BL, Walker DL: Human polyomavirus infections with JC virus and BK virus in renal transplant patients. *Ann Intern Med* 92: 373-378, 1980.
7. Andrews CA, Shah KV, Daniel RW, Hirsch MS, Rubin RH: A serological investigation of BK virus and JC virus infections in recipients of renal allografts. *J Infect Dis* 158: 176-181, 1988.
8. Kwak EJ, Vilchez RA, Randhawa P, Shapiro R, Butel JS, Kusne S: Pathogenesis and management of Polyomavirus infection in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 35: 1081-1087, 2002.
9. Nickeleit V, Hirsch HH, Binet IF, Gudat F, Prince O, Dalquen P, Thiel G, Mihatsch MJ: Polyomavirus infection of renal allograft recipients: From latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol* 10: 1080-1089, 1999.
10. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ, Steiger J: Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 347: 488-496, 2002.
11. Arias LF, Álvarez T, González L, Mendoza ML, Blanco J, García-Asenjo JL, Prats D: BK viral infection in kidney transplantation: importance of «decoy» cells. *Acta Cytol* 47: 1145-1146, 2003.
12. Nickeleit V, Klimkait T, Binet IF, Dalquen P, Zenero VD, Thiel G, Mihatsch MJ, Hirsch HH: Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal allograft recipients with viral nephropathy. *N Engl J Med* 342: 1309-1315, 2000.
13. Drachenberg CB, Beskow CD, Cangro CB, Bourguin PM, Sinsir A, Fink J, Weir MR, Klassen DK, Bartlett ST, Papadimitriou JC: Human polyoma virus in renal allograft biopsies: morphological findings and correlation with urine cytology. *Hum Pathol* 30: 970-977, 1999.
14. Ito M, Hirabayashi N, Uno Y, Nakayama A, Asai J: Necrotizing tubulointerstitial nephritis associated with adenovirus infection. *Hum Pathol* 22: 1225-1231, 1991.
15. Myerowitz RL, Stalder H, Oxman MN, Levin MJ, Moore M, Leith JD, Gantz NM, Hierholzer JC: Fatal disseminated adenovirus infection in a renal transplant patient. *Am J Med* 59: 591-598, 1975.
16. Randhawa PS, Demetris AJ: Nephropathy due to Polyomavirus type BK. *N Engl J Med* 342: 1361-1363, 2002.
17. Haririan A, Hamze O, Drachenberg CB, Ramos E, Weir MR, Klassen DK: Polyomavirus reactivation in native kidneys of pancreas alone allograft recipients. *Transplantation* 75: 1186-1190, 2003.
18. Ramos E, Drachenberg CB, Portocarrero M, Wali R, Klassen DK, Fink JC, Farney A, Hirsch H, Papadimitriou JC, Cangro CB, Weir MR, Barlett ST: BK virus nephropathy diagnosis and treatment: experience at the University of Maryland Renal Transplant Program. *Clin Transpl* 143-153, 2002.
19. Hirsch HH, Steiger J: Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis* 3: 611-623; 2003.