

INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS (CMV) E DA POLIOMA BK VIRUS (BKV) DOPO TRAPIANTO DI RENE

P. De Paolis¹, E. Gervasio¹, M. Tedesco¹, A. Favaro¹, M. Iappelli², S. Di Giulio¹

¹U.O.C. Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Polo Ospedaliero Interaziendale Trapianti, A.O. "S. Camillo-Forlanini", INMI L. Spallanzani, Roma

²UOS Chirurgia dell'Uremico, Polo Ospedaliero Interaziendale Trapianti A.O. "S. Camillo-Forlanini", INMI L. Spallanzani, Roma

Cytomegalovirus and BK polyomavirus infection after renal transplant

Cytomegalovirus (CMV) and BK polyomavirus (BKV) infections have been described in a high percentage of renal transplant patients and are known to cause various complications in renal transplantation. They are closely related to immunosuppressive therapy and implicated in the progression of graft failure. This review focuses on the clinical aspects of CMV and BKV infection after renal transplantation, optimal monitoring, and recent preventive measures and interventions to improve graft function and recipient survival. (G Ital Nefrol 2009; 26 (Suppl. S45): S46-53)

Conflict of interest: None

KEY WORDS:

BKV infection,
CMV infection,
Prevention,
Renal
transplantation

PAROLE CHIAVE:

Infezione da BKV,
Infezione da
CMV,
Prevenzione,
Trapianto di rene

✉ Indirizzo dell'Autore:

Dr. Paolo De Paolis
U.O.C. di Nefrologia, Dialisi e
Trapianto
Azienda Ospedaliera
"S. Camillo-Forlanini"
Largo Forlanini, 1
00151 Roma
e-mail: digiulio@tin.it

INTRODUZIONE

Questa rassegna riporta i più recenti e significativi studi condotti relativamente alle problematiche cliniche delle infezioni da Citomegalovirus (CMV) e da Polioma BK virus (BKV), che più frequentemente si manifestano dopo trapianto renale e che, sempre più, sembrano anche essere correlate da una parte alla terapia immunosoppressiva e dall'altra all'outcome del trapianto stesso. Verranno di seguito descritte le problematiche cliniche, le modalità di diagnosi e di monitoraggio post-trapianto con le diverse proposte terapeutiche in riferimento alla gestione clinica dei pazienti successivamente al trapianto.

INFEZIONE DA CITOMEGALOVIRUS

L'infezione da CMV è la più importante complicazione virale e causa di aumentata morbilità e mortalità in

pazienti sottoposti a trapianto di organi in generale e, in particolar modo, al trapianto di rene.

Alla luce delle diverse problematiche cliniche che sottostanno all'infezione da CMV in pazienti trapiantati, è prioritario ed indispensabile una diagnosi quanto più rapida possibile per poter iniziare precocemente una terapia e ridurre o limitare le sue manifestazioni cliniche.

L'infezione in esame può essere causa di una sindrome sistemica o può presentarsi come una malattia con localizzazione d'organo che, più frequentemente, coinvolge polmoni, tratto gastro-intestinale, fegato, rene e sistema nervoso centrale o periferico (1). La sindrome sistemica è caratterizzata più frequentemente da comparsa di febbre (>38 °C) per almeno due giorni, malessere generale, leucopenia, piastrinopenia, aumento delle transaminasi (almeno due volte il valore normale). Il riscontro della presenza di replicazione sierica del virus, escluse altre eventuali cause, permette di porre la diagnosi corretta.

La malattia d'organo, invece, è caratterizzata da segni e sintomi caratteristici del singolo organo coinvolto (polmone, fegato, tessuto nervoso e meno frequentemente altri organi) e la diagnosi viene fatta con il riscontro del virus con test immunoistochimici o con il riscontro del virus (sottoforma di PCR-CMV qualitativo e quantitativo) su esami biotici dei singoli organi, indipendentemente dal riscontro sierico del virus, in assenza di altre eventuali cause.

DIAGNOSI

La diagnosi per il riscontro della sindrome sistemica viene fatta eseguendo la ricerca del virus e/o di alcuni suoi prodotti, nel sangue.

Diverse metodiche sono state messe a punto in passato nel tentativo di raggiungere una maggiore sensibilità diagnostica in tempi sempre più brevi.

Da alcuni anni l'utilizzo di tecniche più sofisticate, quali la più recente quantificazione del DNA virale con tecnica PCR in *real time*, ha aumentato la sensibilità e la possibilità di ridurre ulteriormente i tempi per la diagnosi (2). Tale tecnica può essere eseguita su leucociti, plasma o sangue intero, ma recenti studi hanno evidenziato come sia quest'ultimo a garantire migliori risultati (3-6). La tecnica, comunque, deve ancora trovare una standardizzazione nelle procedure eseguite dai centri trapianti (sistemi sviluppati in casa o commerciali) per cui sono in corso diverse iniziative per cercare di uniformare le procedure attraverso delle *consensus conference*.

La diagnosi per le localizzazioni d'organo, invece, necessita di tessuti biotici o liquidi biologici (secrezioni locali, fluido del lavaggio broncoalveolare) per l'effettuazione di esami immunoistochimici o per la ricerca diretta del virus e per la quantificazione del DNA virale.

La tradizionale serologia per CMV IgG e IgM è diventata superflua sia per la diagnosi che per il monitoraggio nell'infezione in pazienti trapiantati.

MONITORAGGIO

Altro aspetto ancora in via di definizione è la frequenza del monitoraggio virologico.

Recenti evidenze (7-12) su trapiantati a rischio di infezione da CMV, mostrano come la determinazione quantitativa della DNAemia virale andrebbe eseguita con cadenza settimanale per i primi tre mesi, mentre, in presenza di positività, le determinazioni andrebbero aumentate a due controlli a settimana. Tale procedura permetterebbe una diagnosi quanto mai precoce con conseguente inizio di terapia antivirale.

Dal 3° mese post-trapianto, per evitare la malattia CMV tardiva, il monitoraggio potrebbe essere mensile e solo in casi di trattamenti farmacologici per rigetti acuti o in presenza di indicazioni cliniche particolari dovrebbe essere nuovamente eseguito con cadenza settimanale.

È risaputo, inoltre, che il controllo dell'infezione da CMV sia legato strettamente anche alla risposta immunologica in termini di risposta cellulo-mediata (13-16).

Infatti, la severità dell'infezione è inversamente correlata allo sviluppo o ristabilimento di un'efficiente risposta T mediata (CD4+/CD8+) tanto che in assenza di immunità T mediata si osserva un aumento degli episodi di riattivazione di infezione da CMV.

Tuttavia, non essendo stata ancora raggiunta una standardizzazione delle tecniche per monitorare la risposta immune T mediata attraverso CD4+ e CD8+ (17-22), per un controllo ottimale delle problematiche legate all'infezione da CMV in pazienti trapiantati, sarebbe auspicabile associare un monitoraggio virologico con uno immunologico; tuttavia sono necessari studi prospettici adeguati per confermare tale approccio diagnostico.

PREVENZIONE E TERAPIA

A causa della severità dei risvolti clinici in termini di aumento di morbilità e mortalità conseguenti a infezione da CMV in trapianti di rene, diventa necessaria l'adozione di una strategia per lo stretto monitoraggio dei pazienti ed un rapido inizio di terapia farmacologica.

Le strategie in uso al momento sono riconducibili a due diversi approcci: profilassi antivirale e terapia *preemptive*. Entrambe utilizzano gli stessi farmaci quali Ganciclovir (GCV), Valganciclovir (VGCV), Foscarnet e Cidofovir, che vengono somministrati in tempi e con indicazioni diverse.

La profilassi si basa sul trattamento farmacologico, per almeno 100 giorni dopo il trapianto, di tutti i pazienti trapiantati (indipendentemente dal profilo virologico donatore/ricevente) ed ha il vantaggio della facilità di applicazione. Gli aspetti sfavorevoli sono: gli eventuali effetti tossici dei farmaci conseguenti a somministrazioni prolungate; l'aumento delle probabilità di sviluppare ceppi CMV resistenti alla stessa terapia in presenza di un sottodosaggio della stessa (23, 24); l'aumento di insorgenza di infezione o malattia dopo la sospensione farmacologica; la possibilità di interferenza sulla risposta immune T mediata (15, 25).

La terapia *preemptive*, invece, viene iniziata quando le cariche DNA/CMV su sangue intero raggiungono un determinato livello, prima che compaiano i sintomi clinici e viene interrotta alla negativizzazione della DNA/CMV. Questo approccio, che necessita di uno

stretto e sistematico controllo dei pazienti e richiede maggiore attenzione sia da parte dei clinici che del laboratorio, ha il vantaggio di sottoporre solo una parte di pazienti al trattamento (cioè solo quelli che hanno presentato una replicazione virale significativa), nonché quello, essendo più breve, di esporre i trapiantati a minor effetti tossici della terapia e di comportare costi minori rispetto alla procedura di profilassi antivirale (26).

Un'ultima considerazione va fatta in merito al dosaggio del farmaco somministrato, che deve tener conto del grado di funzione renale e del concetto di resistenza.

In entrambe le strategie (profilassi o terapia *preemptiva*) la dose del farmaco antivirale (sia GCV che VGCV) deve essere modulata in base al grado di funzione renale, per ridurre sia il rischio di accumulo che gli effetti tossici da sovraesposizione. La comparsa di neutropenia deve far sospettare effetti tossici dei farmaci per cui è obbligatoria la loro ulteriore riduzione posologica.

Altro aspetto è la comparsa, sotto terapia, di un ulteriore aumento dei livelli di DNA/CMV su sangue intero; che deve far sospettare la presenza di un ceppo CMV resistente. In questo caso è necessario uno studio fenotipico e genotipico al fine di evidenziare una resistenza "virologica" (con mutazioni sui geni UL97 o UL54 che riducono la suscettibilità alla terapia) o una resistenza "clinica" (riduzione della suscettibilità alla terapia in assenza di mutazioni) che induce una valutazione sulla dose somministrata del farmaco o un adeguamento della terapia immunosoppressiva.

INFEZIONE DA POLIOMA BK VIRUS

L'importanza del BKV in pazienti trapiantati, soprattutto di rene, è legato al suo spiccato tropismo per il tratto genito-urinario. Il BKV è un *virus* ubiquitario, con una incidenza maggiore nei primi anni di vita (tra i 5-7 anni) ed una prevalenza nella popolazione adulta variabile tra il 70-80% (27, 28). L'infezione primaria risulta spesso asintomatica e, solo occasionalmente, può manifestarsi con sintomatologia polmonare e urinaria. Con la fase viremica, il virus trova frequentemente la propria collocazione nelle cellule tubulari renali e nei linfociti, rimanendo in fase silente in condizioni di immunocompetenza del paziente (27, 29-31).

In pazienti trapiantati di rene, l'infezione può essere trasmessa dal rene del donatore o può manifestarsi in seguito alla riattivazione di un virus latente presente nel ricevente (32, 33). Dopo trapianto, il 30-60% dei riceventi sviluppa una viruria, il 10-20% sviluppa una viremia per BK ed il 5-10% sviluppa una nefropatia da BKV (BKVAN). L'incidenza di insufficienza dell'organo

trapiantato in pazienti affetti da BKVAN è valutata tra il 15 e 50% dei soggetti (34) mentre fino al 70% dei pazienti con BKVAN va incontro a perdita dell'organo entro 2-3 anni (35-45).

DIAGNOSI E MONITORAGGIO

L'importanza di una diagnosi quanto più rapida possibile è determinante per le successive scelte terapeutiche, volte, soprattutto in fase iniziale, a modulare la terapia immunosoppressiva e, successivamente, alla somministrazione di terapie antivirali.

La diagnosi viene fatta utilizzando diverse metodiche: verificando la presenza delle *decoy cells* nel sedimento urinario; utilizzando metodiche di PCR con ricerca quantitativa e qualitativa del DNA virale su sangue intero ed urine, o ricercando il virus su riscontri istologici.

La ricerca delle *decoy cells*, cellule dell'epitelio tubulare con nuclei aumentati di volume e contenenti inclusioni virali a carattere basofilo, viene effettuata attraverso un esame rapido e non molto costoso ma poco specifico per la diagnosi di BKVAN (46, 47).

In merito all'utilizzazione delle metodiche PCR, soprattutto quantitative, che al momento sembrerebbero essere quelle con più alta sensibilità e specificità, si discute ancora sulla frequenza con cui eseguire i test, su quale significato possa avere la viruria rispetto alla viremia e su quali siano i *cut-off* per eventuali interventi terapeutici.

Recenti studi propongono controlli settimanali per i primi 4 mesi per poi passare a controlli mensili, proprio per intervenire più rapidamente in caso di positività (48); altri propongono controlli più distanziati (da 2 a 4 settimane) (49).

I controlli vanno continuati fino al raggiungimento di una viremia inferiore al *cut-off* o addirittura fino alla completa negativizzazione (49).

Valore predittivo diverso, invece, sembrano avere la viruria, che mediamente viene riportata tra il 30-60% (35-42) e la viremia. Drachenberg (50) sottolinea come la viruria riportata mediamente tra il 10-20%, preceda la viremia e che la semplice presenza di viruria sia solo la manifestazione di una presenza a livello renale ma non ancora associata a nefropatia. Invece *cut-off* comunque superiori a 10^7 possono essere predittivi di una instaurata forma iniziale di nefropatia anche in assenza di viremia.

D'altro canto la viremia sembra essere molto più rara e la sua presenza, con *cut-off* superiori a 10^4 , deve sempre consigliare l'esecuzione di una biopsia per verificare la presenza o meno di nefropatia (38).

Da evidenziare ancora, come in alcuni studi si sottolinei il diverso andamento sia delle virurie che delle viremie. Brennan (48), per esempio, riporta, in una osser-

TABELLA I - ALTERAZIONI ISTOLOGICHE RENALI IN CORSO DI BKVAN

Stadio	Caratteristiche istologiche
A	Alterazioni citopatiche lievi, tubuli interessati <25% Infiltrato infiammatorio, atrofia tubulare e fibrosi interstiziale assenti o minimi
B	Alterazioni citopatiche da modeste a severe (tubuli interessati: 25-50%) aree focali di infiltrato infiammatorio, atrofia tubulare e fibrosi interstiziale di grado variabile: B1 infiltrato infiammatorio, atrofia tubulare e fibrosi interstiziale <25% B2 infiltrato infiammatorio, atrofia tubulare e fibrosi interstiziale 25-50% B3 infiltrato infiammatorio, atrofia tubulare e fibrosi interstiziale >50%
C	Scarse alterazioni citopatiche in parenchima renale cicatriziale, estesa atrofia tubulare con infiltrato infiammatorio e fibrosi interstiziale.

vazione seriata post-trapianto, come possano comparire sia isolati, occasionali o perduranti, i riscontri di viruria e di viremia. Tali riscontri sicuramente sono dovuti alla possibilità, fornita da controlli stretti e sistematici, di modificare per tempo la terapia immunosoppressiva al fine di tentare di ridurre la replicazione virale.

Il rischio di questo approccio, che sicuramente ha dato buoni risultati, è quello di esporre il paziente ad aumentato rischio di rigetto acuto causato da eccessiva riduzione della terapia immunosoppressiva. Tale rischio, comunque, riducendo con attenzione la terapia immunosoppressiva, sembra attestarsi intorno al 5% (48).

La verifica istologica sembra essere l'esame dirimente per la diagnosi di BKVAN.

La diagnosi in microscopia ottica si basa sul riscontro di alterazioni citopatiche, indotte dal virus a livello delle cellule dell'epitelio tubulare (50-52), legate da una parte all'accumulo di particelle virali neoformate nel nucleo cellulare e, dall'altra, alla lisi cellulare virus-indotta.

Il danno cellulare inizialmente è focale, su pochi nefroni associati ad infiltrato infiammatorio, atrofia tubulare e fibrosi (42, 51, 53-56). Dalla presenza ed estensione delle diverse alterazioni istologiche vengono identificati 3 stadi istologici (A, B, C) (49, 52) (Tab. I), che sembrano essere direttamente correlati all'aumentato rischio di sviluppare un'insufficienza dell'organo trapiantato. Le alterazioni non sono patognomiche di BKVAN, perciò la certezza si raggiunge con

tecniche atte ad identificare l'agente responsabile. Tra le varie tecniche, quella che si basa sull'uso di anticorpi monoclonali diretti verso proteine virali (antigene *large T* di SV40) risulta la più utilizzata, altre, quali ibridizzazione *in situ* o la microscopia elettronica, sono meno utilizzate (51, 54-56).

Il maggior fattore predittivo di evoluzione verso la perdita dell'organo rimane, comunque, il riscontro di fibrosi interstiziale (classe c) all'atto della prima diagnosi istologica (57). L'esecuzione di biopsie seriate per verificare l'evoluzione dell'infezione, gli eventuali effetti benefici della riduzione della terapia immunosoppressiva o il successivo inizio di terapie adiuvanti antivirali in pazienti affetti da BKVAN, ha evidenziato come i riscontri istologici successivi mostrassero l'associazione del grado di fibrosi al diverso peggioramento della funzione renale nel tempo e come eventuali modifiche terapeutiche, in presenza di fibrosi già esistente risultassero inefficaci. In presenza di fibrosi interstiziale, tende ad essere sempre meno utile il controllo delle cariche virali per predire l'evoluzione della malattia, mentre per quadri istologici più lievi, l'effetto della riduzione della terapia immunosoppressiva, sembrerebbe rallentare la progressione della malattia (57). Emerge, pertanto, sempre più stringente la necessità di una diagnosi precoce effettuata prima dell'instaurarsi di fibrosi interstiziale, la cui comparsa renderebbe vana qualunque modifica terapeutica.

TERAPIA

Non esistendo al momento farmaci antivirali specifici per il BKV, la strategia terapeutica di prima scelta nel controllo della replicazione BKV e successiva PVAN, è la riduzione della terapia immunosoppressiva.

L'associazione tra terapia immunosoppressiva e replicazione virale è stretta: l'ipotesi che prevale, in corso di verifica, è che la replicazione sia dovuta ad un'eccessiva immunosoppressione del paziente con conseguente alterazione del sistema immunocompetente.

Gli studi effettuati su un piccolo numero di pazienti mostrano che, in presenza di BKV la prognosi dell'organo trapiantato, se la terapia immunosoppressiva viene aumentata o comunque non viene in alcun modo modificata, è peggiore (54, 58).

Data la suddetta stretta correlazione, è importante valutare anche l'eventuale differente effetto dei singoli farmaci immunosoppressivi sulla replicazione virale.

Già nel 1971, le prime osservazioni in pazienti trapiantati di rene sottolinearono come il BKV potesse essere responsabile di stenosi ureterali in pazienti trattati con Prednisone ed Azatioprina (59). Successivamente, si notò come l'utilizzo nella pratica clinica

TABELLA II - TRATTAMENTO DELLA BKVAN MODIFICANDO L'IMMUNOSOPPRESSIONE DI MANTENIMENTO

Switching	Decreasing	Discontinuing
Tacrolimus → CsA (through levels 100-150 ng/mL) (B-III)	Tacrolimus (through levels <6 ng/mL) (B-III)	Tacrolimus or MMF (maintain of switch to dual drug therapy): CsA/prednisone (B-III)
MMF → azathioprine (dosing ≤ 100 mg/d) (B-III)	MMF dosing ≤ 1 g/day (B-III)	
Tacrolimus → sirolimus (through levels < 6 ng/mL) (C-III)	CsA (through levels 100-150 ng/mL) (B-III)	Tacrolimus/prednisone (B-III)
MMF → sirolimus (through levels < 6 ng/mL) (C-III)		Sirolimus/prednisone (C-III)
MMF → leflunomide (C-III)		MMF /prednisone (C-III)

di ulteriori e più potenti farmaci immunosoppressori, quali Tacrolimus e Micofenolato Mofetil (MMF), e la loro combinazione avesse fatto aumentare l'incidenza dell'infezione rispetto all'era precedente in cui si utilizzavano combinazioni terapeutiche a base di Ciclosporina, Prednisone e Azatioprina (40-42, 54, 59-61). Stesso risultato è emerso da studi relativi a pazienti trattati con Tacrolimus rispetto a quelli trattati con Ciclosporina (61-63).

Brennan (48), in uno studio prospettico e randomizzato, evidenziava una maggior incidenza di viremia in riceventi trattati con Tacrolimus rispetto a quelli trattati con Ciclosporina quando analizzati separatamente, così come pazienti sottoposti a terapia che prevedeva l'associazione Tacrolimus e MMF erano più esposti a maggior incidenza di viremia rispetto al gruppo trattato con Ciclosporina ed Azatioprina. Gli Autori sottolineavano però come la difficoltà di identificare il livello ottimale plasmatico del MMF potesse non rendere pienamente attendibile tale osservazione.

Un'altra possibilità terapeutica che ha dato buoni risultati in merito al controllo della viremia è la sostituzione degli Inibitori delle calcineurine con gli Inibitori mTor (64).

La mancanza di omogeneità nell'approccio terapeutico fa sì che molti studi clinici riportino strategie diverse effettuate su piccole popolazioni in studio.

L'unico dato certo è che un tardivo inizio, rispetto alla progressione istologica (BKVAN B3 o C), della riduzione dell'immunosoppressione, comporta una elevata incidenza di perdita di organo (41, 65). Mentre una repentina riduzione della terapia immunosoppressiva, guidata da una strategia di controllo virologico stretto, è in grado di prevenire la progressione del danno renale con conseguente miglioramento della prognosi (38, 42, 65, 66).

Per tali motivi Hirsch (49) propose una strategia basata su una serie di modifiche, quali la sostituzione,

la riduzione o la sospensione di singoli farmaci immunosoppressivi per il controllo della replicazione del BKV (Tab. II). Tuttavia, in seguito alla riduzione della terapia immunosoppressiva, aumenta la probabilità di insorgenza di rigetto acuto. Diversi studi hanno confermato l'aumento di rigetti acuti dopo questa strategia terapeutica, rigetti, però, che si manifestano sempre come steroido-sensibili e che non determinano successivamente un aumentato rischio di replicazione virale e BKVAN (38, 54, 58, 67).

Altro fattore di rischio che favorisce la replicazione virale è la presenza di stent uretero-vescicale che, frequentemente, è associata a più alto sviluppo di viruria e viremia, anche se risulta ancora sconosciuta la causa dell'associazione (48).

Nel caso in cui la riduzione della terapia immunosoppressiva non fosse sufficiente per il controllo della replicazione virale, vengono proposte, da diversi Autori, terapie adiuvanti ancora in corso di validazione: basse dosi di Cidofovir ev (68-72), Leflunomide per os (73), infusioni di Immunoglobuline (74) o Chinolonici (75). Il ridotto numero di pazienti trattati, comunque, non offre la possibilità di certezze terapeutiche e studi più estesi sono attesi per verificarne gli effetti positivi.

Recenti osservazioni, sia su adulti che su una popolazione pediatrica (48, 76), consigliano un intervento *preemptive*. Tale trattamento, attraverso uno stretto monitoraggio della viremia e dell'eventuale riattivazione, che normalmente precede di alcune settimane l'insorgenza di BKVAN (38), permette una significativa modulazione della terapia immunosoppressiva (con la sospensione del terzo farmaco e/o riduzione dell'inibitore delle calcineurine con *through levels* più bassi) ed il raggiungimento della negativizzazione della carica virale senza rischio significativo di rigetto acuto.

CONCLUSIONI

Le infezioni da CMV e BKV nel trapianto di rene stanno, nel tempo, rivestendo sempre più importanza nella gestione del paziente trapiantato.

La possibilità di migliorare in futuro la nostra conoscenza sulla storia naturale delle infezioni da CMV e BKV, di avere più opportunità diagnostiche, sia strumentali che di laboratorio, di far sempre più riferimento all'esame istologico e di disporre di differenti protocolli farmacologici, sta permettendo di ridurre al massimo gli effetti negativi sull'organo trapiantato e sul ricevente di trapianto di rene.

Tuttavia sono ancora necessari studi controllati e randomizzati su popolazioni più vaste per confermare definitivamente i buoni risultati fino ad oggi ottenuti.

RIASSUNTO

Citomegalovirus (CMV) e Polioma BK virus (BKV) sono altamente prevalenti nei trapiantati renali, con una larga varietà di complicanze, strettamente correlate alla terapia immunosoppressiva e coinvolte nella malattia progressiva del rene trapiantato. Questa rassegna focalizza gli aspetti clinici dell'infezione da CMV e BKV dopo trapianto renale, presenta il monitoraggio ottimale e le più recenti misure di prevenzione ed intervento, volte a migliorare la funzione del graft e la sopravvivenza del ricevente.

DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi

BIBLIOGRAFIA

1. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1094-7. Epub 2002 Mar 11.
2. Gerna G, Zavattoni M, Baldanti F, et al. Human cytomegalovirus (HCMV) leukodnaemia correlates more closely with clinical symptoms than antigenemia and viremia in heart and hearth-lung transplant recipients with primary HCMV infection. *Transplantation* 1998; 65 (10): 1378-85.
3. Razonable RR, Brown RA, Wilson J, et al. The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in transplant recipients with CMV disease. *Transplantation* 2002; 73: 968-73.
4. Weinberg A, Schissel D, Giller R. Molecular methods for cytomegalovirus surveillance in bone marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4203-6.
5. Cortez KJ, Fischer SH, Fahle GA, et al. Clinical trial of quantitative real-time polymerase chain reaction for detection of cytomegalovirus in peripheral blood of allogeneic hematopoietic stem-cell transplant recipients. *J Infect Dis* 2003; 188: 967-72. Epub 2003 Sep 11.
6. Mengelle C, Sandres-Sauné K, Pasquier C, et al. Automated extraction and quantification of human cytomegalovirus DNA in whole blood by real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3840-5.
7. Razonable RR, van Crujisen H, Brown RA, et al. Dynamics of cytomegalovirus replication during preemptive therapy with oral ganciclovir. *J Infect Dis* 2003; 187: 1801-8. Epub 2003 May 9.
8. Paya CV, Wilson JA, Espy MJ, et al. Preemptive use of oral ganciclovir to prevent cytomegalovirus infection in liver transplant patients: a randomized, placebo-controlled trial. *J Infect Dis* 2002; 185: 854-60. Epub 2002 Mar 19.
9. Gerna G, Baldanti F, Lilleri D, et al. Human cytomegalovirus pp67 mRNAemia versus pp65 antigenemia for guiding preemptive therapy in heart and lung transplant recipients: a prospective, randomized, controlled, open-label trial. *Transplantation* 2003; 75: 1012-9.
10. Gerna G, Lilleri D, Baldanti F, et al. Human cytomegalovirus immediate-early mRNAemia versus pp65 antigenemia for guiding pre-emptive therapy in children and young adults undergoing hematopoietic stem cell transplantation: a prospective, randomized, open-label trial. *Blood* 2003; 101: 5053-60. Epub 2003 Feb 13.
11. Gerna G, Baldanti F, Torsellini M, et al.; Bergamo Transplant Group. Evaluation of cytomegalovirus DNAemia versus pp65-antigenaemia cutoff for guiding preemptive therapy in transplant recipients: a randomized study. *Antivir Ther* 2007; 12: 63-72.
12. Lilleri D, Gerna G, Furione M, et al. Use of a DNAemia cut-off for monitoring human cytomegalovirus infection reduces the number of preemptively treated children and young adults receiving haematopoietic stem-cell transplantation compared with qualitative pp65-antigenemia. *Blood* 2007; 110 (7): 2757-60. Epub 2007 Jun 19.
13. Quinnan GV Jr, Kirmani N, Rook AH, et al. Cytotoxic T cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med* 1982; 307: 7-13.
14. Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, Greenberg PD. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 1991; 78: 1373-80.
15. Li CR, Greenberg PD, Gilbert MJ, Goodrich JM, Riddell SR. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood* 1994; 83: 1971-9.
16. Rentenaar RJ, Gamadia LE, van DerHoek N, et al. Development of virus-specific CD4(+) T cells during primary cytomegalovirus infection. *J Clin Invest* 2000; 105: 541-8.
17. Gratama JW, van Esser JW, Lamers CH, et al. Tetramer-

- based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection. *Blood* 2001; 98: 1358-64.
18. Cwynarski K, Ainsworth J, Cobbold M, et al. Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2001; 97: 1232-40.
 19. Kern F, Faulhaber N, Frömmel C, et al. Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1676-82.
 20. Ozdemir E, St John LS, Gillespie G, et al. Cytomegalovirus reactivation following allogeneic stem cell transplantation is associated with the presence of dysfunctional antigen-specific CD8+ T cells. *Blood* 2002; 100: 3690-7. Epub 2002 Jul 5.
 21. Lilleri D, Gerna G, Fornara C, Lozza L, Maccario R, Locatelli F. Prospective simultaneous quantification of human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cell reconstitution in young recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Blood* 2006; 108: 1406-12. Epub 2006 Apr 13.
 22. Gerna G, Lilleri D, Fornara C, et al. Monitoring of human cytomegalovirus-specific CD4 and CD8 T-cell immunity in patients receiving solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 2356-64. Epub 2006 Aug 1.
 23. Emery VC, Griffiths PD. Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 8039-44.
 24. Limaye AP, Raghun G, Koelle DM, Ferrenberg J, Huang ML, Boeckh M. High incidence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection among lung transplant recipients receiving preemptive therapy. *J Infect Dis* 2002; 185: 20-7. Epub Dec 14.
 25. Hakki M, Riddell SR, Storek J, et al. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood* 2003; 102: 3060-7. Epub 2003 Jul 3.
 26. Kusne S, Grossi P, Irish W, et al. Cytomegalovirus PP65 antigenemia monitoring as a guide for preemptive therapy: a cost effective strategy for prevention of cytomegalovirus disease in adult liver transplant recipients. *Transplantation* 1999; 68: 1125-31.
 27. Knowles WA. Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV). *Adv Exp Med Biol* 2006; 577: 19-45.
 28. Lundstig A, Diliner J. Serological diagnosis of human polyomavirus infection. *Adv Exp Med Biol* 2006; 577: 96-101.
 29. Randhawa P, Vats A, Shapiro R. The pathobiology of polyomavirus infection in man. *Adv Exp Med Biol* 2006; 577: 148-59.
 30. Ashok A, Atwood WJ. Virus receptors and tropism. *Adv Exp Med Biol* 2006; 577: 60-72.
 31. Doerries K. Human polyomavirus JC and BK persistent infection. *Adv Exp Med Biol* 2006; 577: 102-16.
 32. Hariharan S. BK virus nephritis after renal transplantation. *Kidney Int* 2006; 69: 655-62.
 33. Hirsch HH. BK virus: opportunity makes a pathogen. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 354-60. Epub 2005 Jun 14.
 34. Djamali A, Samaniego M, Muth B, et al. Medical care of kidney transplant recipients after the first posttransplant year. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1: 623-40. Epub 2006 Mar 29.
 35. Mackenzie EF, Poulding JM, Harrison PR, Amer B. Human polyoma virus (HPV)—a significant pathogen in renal transplantation. *Proc Eur Dial Transplant Assoc* 1978; 15: 352-60.
 36. Gardner SD, MacKenzie EF, Smith C, Porter AA. Prospective study of the human polyomaviruses BK and JC and cytomegalovirus in renal transplant recipients. *J Clin Pathol* 1984; 37: 578-86.
 37. 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* 1980; 92: 373-8.
 38. 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: 488-96.
 39. 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: 1309-15.
 40. Ramos E, Drachenberg CB, Portocarrero M, et al. BK virus nephropathy diagnosis and treatment; experience at the University of Maryland Renal Transplant Program. *Clin Transpl* 2002; 143-53.
 41. Ramos E, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, et al. Clinical course of polyoma virus nephropathy in 67 renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2145-51.
 42. Buherig CK, Lager DJ, Stegall MD, et al. Influence of surveillance renal allograft biopsy on diagnosis and prognosis of polyomavirus-associated nephropathy. *Kidney Int* 2003; 64: 665-73.
 43. 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. Epub 2007 Sep 12.
 44. Alangaden GJ, Thyagarajan R, Gruber SA, et al. Infectious complications after kidney transplantation: current epidemiology and associated risk factors. *Clin Transplant* 2006; 20: 401-9.
 45. Beimler J, Sommerer C, Zeier M. The influence of immunosuppression on the development of BK virus nephropathy—does it matter? *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22 (Suppl 8): viii66-71.
 46. Kapila K, Nampoory MR, Johnny KV, et al. Role of urinary cytology in detecting human polyoma bk virus in kidney transplant recipients. A preliminary report. *Med Princ Pract* 2007; 16: 237-9.
 47. Kipp BR, Sebo TJ, Griffin MD, Ihrke JM, Halling KC. Analysis of polyomavirus-infected renal transplant recipients' urine specimens: correlation of routine urine cytology, fluorescence in situ hybridization, and digital image analysis. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 854-61.
 48. 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: 582-94.
 49. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation* 2005; 79: 1277-86.
 50. 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): 373-81.
 51. Nicleleit V, Singh HK, Mihatsch MJ. Polyomavirus nephropathy: morphology, pathophysiology, and clinical management. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12 (6): 599-605.
 52. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hirsch HH, et al. Histological patterns of polyomavirus nephropathy: correlation with graft outcome and viral load. *Am J Transplant* 2004; 4 (12): 2082-92.

53. Ginevri F, Azzi A, Botti G, Comoli P. La nefropatia associata all'infezione da polyomavirus BK dopo trapianto renale. *G Ital Nefrol* 2006; 23 (6): 575-84.
54. Randhawa PS, Finkelstein S, Scantlebury V, et al. Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation* 1999; 67: 103-9.
55. Nickeleit V, Hirsch HH, Binet IF, et al. Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10 (5): 1080-9.
56. Drachenberg CB, Beskow CO, Congro CB, et al. Human polyoma virus in renal allograft biopsies: morphological findings and correlation with urine cytology. *Human Pathol* 1999; 30 (8): 970-7.
57. Wadei HM, Rule AD, Lewin M, et al. Kidney transplant function and histological clearance of virus following diagnosis of polyomavirus-associated nephropathy (PVAN). *Am J Transplant* 2006; 6: 1025-32.
58. Celik B, Shapiro R, Vats A, Randhawa PS. Polyomavirus allograft nephropathy: sequential assessment of histologic viral load, tubulitis, and graft function following changes in immunosuppression. *Am J Transplant* 2003; 3: 1378-82.
59. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (BK) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1971; 1: 1253-7.
60. Mengel M, Marwedel M, Radermacher J, et al. Incidence of polyomavirus-nephropathy in renal allograft: influence of modern immunosuppressive drugs. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1190-6.
61. Barri YM, Ahmad I, Ketel BL, et al. Polyoma viral infection in renal transplantation: the role of immunosuppressive therapy. *Clin Transplant* 2001; 15: 240-6.
62. Tong CY, Hilton R, MacMahon EM, et al. Monitoring the progress of BK virus associated nephropathy in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 2598-605. Epub 2004 Aug 3.
63. Mathur VS, Olson JL, Darragh TM, Yen TS. Polyomavirus-induced interstitial nephritis in two renal transplant recipients: case reports and review of the literature. *Am J Kidney Dis* 1997; 29: 754-8.
64. Wali RK, Drachenberg C, Hirsch HH, et al. BK virus-associated nephropathy in renal allograft recipients: rescue therapy by sirolimus-based immunosuppression. *Transplantation* 2004; 78: 1069-73.
65. 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: 1834-9.
66. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Wali R, et al. Improved outcome of polyoma virus allograft nephropathy with early biopsy. *Transplant Proc* 2004; 36 (3): 758-9.
67. Trofe J, Gaber LW, Stratta RJ, et al. Polyomavirus in kidney and kidney-pancreas transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2003; 5 (1): 21-8.
68. Keller LS, Peh CA, Nolan J, Bannister KM, Clarkson AR, Faull RJ. BK transplant nephropathy successfully treated with cidofovir. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1013-4.
69. Lim WH, Matthew TH, Cooper JE, Bowden S, Russ GR. Use of cidofovir in polyomavirus BK viral nephropathy in two renal allograft recipients. *Nephrology (Carlton)* 2003; 8: 318-23.
70. Kuypers DR, Vandooren AK, Lerut E, et al. Adjuvant low-dose cidofovir therapy for BK polyomavirus interstitial nephritis in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2005; 5: 1997-2004.
71. Kadambi PV, Josephson MA, Williams J, et al. Treatment of refractory BK virus-associated nephropathy with cidofovir. *Am J Transplant* 2003; 3: 186-91.
72. Vats A, Shapiro R, Singh Randhawa P, et al. Quantitative viral load monitoring and cidofovir therapy for the management of BK virus-associated nephropathy in children and adults. *Transplantation* 2003; 75: 105-12.
73. Williams JW, Javadi B, Kadambi PV, et al. Leflunomide for polyomavirus type BK nephropathy. *N Engl J Med* 2005; 352: 1157-8.
74. Puliyananda DP, Amet N, Hilo L, et al. IVIG contains antibodies reactive with polyoma BK virus and may represent a therapeutic option for BK nephropathy. *Am J Transplantation* 2003; 3 (Suppl. 3): 393.
75. Chandraker A, Ali S, Drachenberg CB, et al. Use of fluoroquinolones to treat BK infection in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2004; 4: 587.
76. 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): 2727-35. Epub 2007 Oct 1.