

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Gabriel Godinho Pinto

**Avaliação da viremia pelo BKPyV
pós-transplante renal e
determinação do ponto de corte para
predição de nefropatia associada ao
vírus**

UFCSPA
**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2016**

**Programa de Pós-Graduação em Patologia Universidade
Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre**

Gabriel Godinho Pinto

**Avaliação da viremia pelo BKPyV
pós-transplante renal e
determinação do ponto de corte para
predição de nefropatia associada ao
vírus**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro C. Pasqualotto
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Elizete Keitel

**Porto Alegre
2016**

Agradecimentos

Agradeço à família e aos amigos, pelo apoio e incentivo incondicional.

A Rejane Tavares, por ter permitido o primeiro contato com meu orientador Alessandro Pasqualotto e à ele também dedico meus agradecimentos, primeiramente por ter acreditado em meu potencial, pela orientação e dedicação ao longo deste percurso.

Aos colegas de trabalho, os quais promoveram todo auxílio, o qual foi imprescindível para o aperfeiçoamento e finalização da tese;

Agradeço à Mariana Loch, minha noiva e companheira, que esteve sempre me acompanhando ao longo do meu caminho, dando estímulo e suporte.

Por fim, à todos os que contribuíram direta ou indiretamente para que este momento fosse possível, em especial a “Turma do Bem”, muito obrigado por tudo.

Sumário

1. Introdução	10
1.1. Poliomavírus	12
1.2. Genoma do BKPyV	14
1.3. Transmissão	15
1.4. Fatores de risco associado ao desenvolvimento de BKVN	16
1.5. Diagnóstico laboratorial utilizado para prevenção de BKVN	17
1.5.1. Citopatologia urinária	19
1.5.2. qPCR em urina e plasma	19
1.6. Tratamento	21
1.7. Referências Bibliográficas	22
2. Objetivo	31
2.1. Objetivo geral	31
2.2. Objetivos específicos	31
3. Artigos Científicos	32
3.1. Evaluation of different urine protocols and DNA extraction methods for quantitative detection of BK viremia in kidney transplant patients	32
3.2. Analysis of diagnosis methods as a screening test to detect BK virus nephropathy in kidney transplant patients	32
3.3. Quantitative detection of BK virus in kidney transplant recipients: a prospective validation study	32
4. Considerações Finais	32
5. Anexos	32
5.1. Metodologia	32

5.1.1 Desenho do estudo	32
5.1.2. Critérios de inclusão dos pacientes	32
5.1.3. Amostras	32
5.1.4. Critério de exclusão dos pacientes	32
5.2. Aprovação pelos Comitês de Ética em pesquisa	32
5.3. Termo de Consentimento livre e Esclarecido	32
5.4. Planilha de coleta de dados dos pacientes	32

Lista de abreviaturas utilizadas

qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativo

BKPyV: Poliomavírus BK

BKVN: Nefropatia por BKPyV

OPTN: *Organ Procurement and Transplantation Network*

SRTS: *The Scientific Registry of Transplant Recipients*

HR: *Hazard Ratio*

IC: Intervalo de confiança

JCPyV: Poliomavírus JC

SV40: Simian Vírus 40

PML: Leucoencefalopatia multifocal progressiva

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

tAg: genes tumoral-t pequeno

TAg: genes tumoral-t grande

Trunc-TAg: genes tumoral-T truncado

pRb: proteína do retinoblastoma

VP1: Proteína do capsídeo 1

VP2: Proteína do capsídeo 2

VP3: Proteína do capsídeo 3

NCCR: região não codificadora

HLA: Antígeno leucocitário humano

IgG: Imunoglobulina G

MMF: Micofenolato mofetil

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

AST: American Society of Transplantation

Resumo da Dissertação

Introdução: O transplante renal é o tratamento de escolha para a doença renal crônica de estágio final. O período de maior mortalidade após o transplante é até o terceiro mês, entretanto após um ano a taxa de sobrevivência é ~80% maior quando comparada aos pacientes que permaneceram sem diálise. Atualmente uma das complicações do transplante renal é a infecção por poliomavírus BK (BKPyV) que pode levar a perda da função do enxerto. Testes não invasivos como a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) são descritos como testes de escolha para rastreamento da infecção ativa e como o valor da carga viral pode indicar nefropatia presuntiva por BKPyV em estágios iniciais da doença. Entretanto, na literatura não há um consenso quanto ao ponto de corte da virúria e viremia que melhor prediz nefropatia por BKV (BKVN), sendo necessário que cada centro estabeleça seus próprios valores.

Objetivos: Estabelecer o ponto de corte para carga viral virúria e viremia que melhor prediz a BKVN em nossas instituições e avaliar os fatores relacionados do desenvolvimento da BKVN.

Material e Métodos: Foram incluídos 200 pacientes submetidos a transplante renal, ambos os sexos e ≥ 18 anos. Os pacientes foram acompanhados por 9 meses e a cada trimestre amostras de urina e sangue foram coletadas para posterior extração de DNA e pesquisa de BKPyV. A extração de DNA e detecção do ponto de corte para BKVN foram feitos por kits comerciais. O desenvolvimento do teste *in-house* foi validado através da linearidade com o teste comercial.

Resultados: A prevalência de BKVN foi de 4%. Os pontos de corte para virúria e viremia que melhor inferiu BKVN foram $\geq 5,7 \log$ e $\geq 3,8 \log$ cópias/mL, respectivamente. Com 100% de sensibilidade e de valor preditivo negativo, a urina mostra-se como excelente material para o rastreio da doença; já a viremia mostrou especificidade e valor preditivo positivo de 96% e 64%, respectivamente, sendo o material de escolha para predizer BKVN.

Conclusões: O uso do qPCR é uma ótima ferramenta de rastreio para infecção por BKPyV. Ao se definir o melhor ponto de corte para nossas instituições melhoramos a detecção dos possíveis casos de BKVN, muitos dos quais possivelmente não viessem a ser diagnosticados se utilizássemos outros pontos de corte já validados na literatura.

Palavras-chave: Transplante renal; Nefropatia por BK vírus; qPCR; Biópsia renal; Viremia; Virúria.

1. Introdução

O transplante renal é a modalidade mais comum de transplante de órgão sólido e a última linha de tratamento para os pacientes de doença renal crônica em estágio terminal Suthanthiran e Strom, 1994. Segundo dados do Registro Brasileiro de Transplante (RBT) o rim é o órgão mais transplantado no Brasil, com 5.433 transplantes realizados no ano de 2013. Comparando-se com outros países, o Brasil fica atrás somente dos Estados Unidos, onde ocorreram 18.005 transplantes, no mesmo ano (RBT, 2014). No Brasil, o número de transplantes renais vem aumentando desde o ano de 2007, com um crescimento de 3,5% no ano de 2014; essa elevação se deu principalmente pelo incremento dos transplantes com doador falecido o qual aumentou 4,7%, enquanto que o transplante com doador vivo estabilizou-se no ano de 2014 após uma queda de 22% nos seis anos anteriores (RBT, 2014).

Segundo dados do publicados pelo *Organ Procurement and Transplantation Network* (OPTN) juntamente com o *The Scientific Registry of Transplant Recipients* (SRTS), ambos localizados nos Estados Unidos, mostram que a sobrevida do enxerto proveniente de doador vivo é maior quando comparado com o de doador falecido, após cinco anos de acompanhamento: 85,7% e 73,5%, respectivamente (Hart e cols., 2014). O período de maior risco de morte para receptor de doadores falecido são os três primeiros meses após o transplante (*Hazard Ratio* (HR) 2,0 [Intervalo de Confiança (IC) 95% (1,5–2,7)] comparado ao dos pacientes em diálise. Após esse período observa-se um aumento na sobrevida dos pacientes transplantados, podendo chegar a ~80%, quando comparado com os pacientes em diálise não submetidos ao transplante (3–6 meses HR 0,45 [IC 0,27–0,74];

6–11 meses HR 0,23 [IC 0,14–0,27; ≥12meses HR 0,15 [IC 95% 0,12–1,19]]; o risco de morte, 60 dias após a perda da função do enxerto mostra-se mais elevado dentre os pacientes que perderam a função do enxerto até 12 meses após o transplante comparado aos que morreram com o enxerto funcionando (McDonald e Russ, 2002). Ao longo da última década, a taxa de morte com o enxerto funcionando para receptores de doadores vivos e falecidos permaneceu estável, o que indica uma taxa maior de transplantes em receptores mais velhos, os quais estão propensos a falecer antes do enxerto falhar (Hart e cols., 2014).

Com o avanço da terapia com imunossupressores desde a década de 1980, a taxa de sobrevivência do enxerto aumentou para ~95% no primeiro ano pós-transplante (Pascual e cols., 2002; Barraclough e cols., 2011). Embora ao longo das últimas duas décadas tenha havido uma redução na perda do órgão no primeiro ano pós-transplante, a prevalência de perda do enxerto ainda atinge percentuais tão elevados quanto 77% e 56%, para cinco e dez anos pós-transplante, respectivamente (Legendre e cols., 2014), estando essas taxas relacionadas, em parte, à imunossupressão de longo prazo.

A infecção pelo poliomavírus BK (BKPyV) é uma das complicações relacionadas ao uso de imunossupressores (Drachenberg e cols., 2007). Após a infecção o BKPyV possui tropismo para o sistema renal, onde permanece em estado de latência (Bohl e Brennan, 2007). A reativação do vírus pode ocorrer em pessoas imunocompetentes (Hirsch e Steiger, 2003), entretanto, taxas mais altas são observadas em pacientes imunocomprometidos (Barraclough e cols., 2011). As alterações clínicas causadas pelo BKPyV, no entanto, são observadas em pacientes com algum comprometimento da resposta imune

(Barracough e cols., 2011), tendo sido reportado em mulheres grávidas, pacientes com câncer, paciente com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), e em pacientes submetidos a transplante de medula óssea e de órgão sólido (Bohl e Brennan, 2007; Gilis e cols., 2014). No transplante renal, a infecção pelo BKPyV pode apresentar diferentes manifestações clínicas: estenose uretérica, cistite hemorrágica e disfunção renal progressiva levando a nefropatia por BKPyV (BKVN); a BKVN é a causa mais importante para a perda do enxerto por perda de sua função (Bohl e Brennan, 2007; Barracough e cols., 2011; Elfadawy e cols., 2014).

1.1. Poliomavírus

O BKPyV e o poliomavírus JC (JCPyV), pertencem à família Polyomaviridae, gênero Orthopolyomavirus, sendo os únicos vírus deste grupo com potencial patogênico que infectam humanos. O Simian vírus 40 (SV40), cujos hospedeiros são os primatas, é outro representante dessa família; sua importância provém da similaridade genômica da proteína do capsídeo VP-1 (>70%) com o BKV e JCPyV, sendo utilizados anticorpos anti-SV40 no diagnóstico por imunistoquímica para ambos os vírus (Hirsch e cols., 2005; John e cols., 2011). O SV40 teve grande repercussão da década de 60 por estar presente na vacina da poliomielite, uma vez que o cultivo do poliovírus deu-se em células de rim de macacos Rhesus e acredita-se que tenha sido introduzido na população humana por meio da vacina (Stratton e cols., 2002). Dentre os poliomavírus anteriormente citados vale citar a importância do BKV e o JCPyV para o transplante renal, uma vez que são os únicos associados ao

desenvolvimento de nefropatia (Drachenberg e cols., 2007; Kantarci e cols., 2011).

O JCPyV é raramente associado com nefropatia em pacientes transplantados. O primeiro caso reportado foi em 2003 e, desde então, poucos casos adicionais foram descritos (Kazory e cols., 2003; Lautenschlager e cols., 2014). Entretanto, o JCPyV tem notória importância como agente da leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML), uma infecção oportunista do sistema nervoso central, frequente em pessoas com grave comprometimento da imunidade, seja por uso de potentes imunossupressores sistêmicos ou devido à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), o qual corresponde a 80-90% dos casos. Normalmente, os pacientes são levados a óbito em poucos meses, sendo, no entanto, em alguns casos, possível reverter a doença, muito embora dificilmente os pacientes fiquem livres de sequelas neurológicas (Wollebo e cols., 2015).

Por outro lado, o BKPyV está associado a doenças do trato urinário, como agente de cistite hemorrágica no transplante de medula óssea e de nefropatia no transplante renal (Gilis e cols., 2014; Hirsch e cols., 2005). Estudos de soro prevalência mostraram que mais de 80% da população geral possui anticorpos específicos para BKPyV (Knowles, 2006) e reativações periódicas podem ocorrer tanto na população imunocompetente (0–62%) como em pacientes imunocomprometidos (Hirsch e Steiger, 2003). BKPyV foi isolado pela primeira vez por Gardner e cols. (1971) na urina de um paciente quatro meses após o transplante renal, o qual já havia tido dois episódios de rejeição aguda (o vírus recebeu por nome as iniciais do paciente, B.K.). Entretanto, foi somente após 24 anos que o BKPyV foi associado com a perda da função do

enxerto no transplante renal. No exame patológico, foi observado infiltrado inflamatório intersticial, com células epiteliais tubulares apresentando um alargamento basófilo no núcleo e com teste de imunistoquímica positivo para SV40 (Purighalla e cols., 1995). Na atualidade, a prevalência de BKVN em transplantados de rim tem variado de 1-13% (mediana 4,5%), levando à perda do enxerto em mais de 80% dos casos, até cinco anos após o transplante (Hirsch e cols., 2005; Costa e Cavallo, 2012).

1.2. Genoma do BKPyV

Os poliomavírus são vírus pequenos, com aproximadamente 40 nm de diâmetro e não envelopados. O capsídeo tem o formato icosaédrico composto por 72 capsômeros Yan e cols., 1996. Esse circunda o genoma que é composto por dupla fita de DNA circular com ~5.000 pb, o qual pode ser dividido em 3 partes: região precoce, tardia e não-codificante (NCCR). A região precoce é composta pelos genes tumoral-t pequeno (tAg), tumoral-T grande (TAg) e truncado (trunc-TAg). Esses genes dão origem a proteínas com seus respectivos nomes (Abend e cols., 2009) as quais são essenciais para a regulação da replicação e expressão viral. O TAg possui característica oncogênica levando a imortalização celular por interagir com as proteínas da família pRb, p53, p107 e p130 (Harris e cols., 1996). Os genes da região tardia codificam as três proteínas do capsídeo (VP1, VP2 e VP3) e a agnoproteína. A proteína grande do capsídeo VP1 tem uma estrutura pentamérica e a ela liga-se a uma proteína VP2 ou VP3 (Yan e cols., 1996) e a agnoproteína facilita a exocitose celular do vírion (Johannessen e cols., 2011). A região NCCR contém

elementos promotores dos genes localizados na região precoce e favorece o início da replicação viral (Jiang e cols., 2009).

A partir da variabilidade genética da proteína VP1 o BKV é dividido em quatro genótipos (I–IV). O genótipo I possui ampla distribuição mundial e é dividido em subgrupos I/a, I/b-1 (África), I/b-2 (Europa), I/c (noroeste da Ásia). O genótipo IV compreende seis subgrupos (IV/a-1, IV/a-2, IV/b-1, IV/b-2, IV/c-1, IV/c-2), exceto o IV/c-2 todos os outros subgrupos são prevalentes no leste asiático, sendo esse prevalente na Europa e no noroeste da Ásia. Assim especula-se que a variação dos subgrupos do BKPyV podem estar relacionados com a migração do povo europeu, americano e asiático (Zhong e cols., 2009). No Brasil, URBANO (2013) avaliou a urina de 71 pacientes saudáveis, com maior prevalência para o genótipo I (79%), especialmente subgrupo I/a (63%), seguido do genótipo IV (10%) e II (5%) (Urbano, 2013). Além disso, Zalona e cols. (2011) ao investigar 51 pacientes submetidos a transplante renal encontraram o genótipo I em 96% dos pacientes com predomínio subgrupo I/b (67%). Esses achados podem estar relacionados tanto com a vinda de imigrantes europeus, ao longo dos anos, para o Brasil e pelo período da escravatura no período colonial.

1.3. Transmissão

O BKPyV encontra-se difundido em todos os continentes, não estando restringido a países menos desenvolvidos e nem a grupos socioeconômicos. A infecção primária pelo BKPyV usualmente ocorre na infância, geralmente nos primeiros anos de vida, com prevalência de 83% até os dois anos e de 65-90% aos 5-9 anos (Knowles, 2006). A rota natural de transmissão do BKPyV ainda

permanece indefinida; entretanto, suspeita-se que possa haver transmissão por meio de aerossóis do trato respiratório (BKPyV presente na amídalas de crianças), saliva, pelas rotas uro-oral e oro-fecal, transfusão de sangue, por relação sexual e por água não tratada, sendo esse último um dos seus principais reservatórios (Siguier e cols., 2012).

A infecção primária pelo BKPyV costuma ser subclínica ou assemelhar-se a um resfriado (Hirsch, 2005). Com o processo de replicação viral no local da primoinfecção, o vírus atinge a corrente sanguínea, disseminando-se pelo corpo onde ocorre tropismo principalmente para as células renais e uroteliais e bexiga. Também pode ocorrer infecção secundária nos leucócitos, fígado, pulmões, próstata e cérebro (Hirsch e Steiger, 2003; Pahari e Rees, 2003). Após, o vírus entra em estado de latência nos órgãos acima citados enquanto o hospedeiro não apresentar alterações na imunocompetência, seja por motivo patológico ou por regime medicamentoso.

1.4. Fatores de risco associado ao desenvolvimento de BKVN

O principal fator de risco relacionado ao desenvolvimento de BKVN é o estado de imunossupressão do paciente, pois os sinais clínicos associados a doença são observados, em sua maioria, em pacientes imunossuprimidos (Hirsch e Steiger, 2003). Diversos estudos mostraram que ao diminuir a imunossupressão do paciente promove-se consecutivamente uma redução na carga viral do BKPyV (Hirsch e Steiger, 2003). Outros fatores de risco que influenciam na replicação do BKPyV e desenvolvimento de BKVN são: (i) uso de imunoglobulina, (ii) alta incompatibilidade do antígeno leucocitário humano (HLA), (iii) rejeição aguda prévia e (iv) características ligadas ao doador e o

receptor (sexo, idade e tipo de doador) (Dall e Hariharan, 2008; Dharnidharka e cols., 2009). Tabela 1.

Tabela 1. Fatores de risco associados ao desenvolvimento de nefropatia associada ao vírus BK.

	Fator de Risco	Referência
Fatores de risco associados ao doador	Incompatibilidade do HLA	(Awadalla e cols., 2004)
	Doador do sexo feminino	(Khamash e cols., 2007)
Fatores de risco associados ao receptor	Idade >55 anos	(Khamash e cols., 2007)
	Receptor de cor branca	(Rocha e cols., 2004)
	Receptor do sexo masculino	(Rocha e cols., 2004)
	Receptor soronegativo	(Smith e cols., 2004)
Fatores de risco associados ao transplante	Receptores com deficiência humoral (BKV IgG)	(Ginevri e cols., 2003)
	Rejeição aguda prévia	(Awadalla e cols., 2004)
	Uso de terapia antilinfócitos	(Awadalla e cols., 2004)
	Nível de MMF	(Ginevri e cols., 2003)
	Alta concentração de tacrolimos	(Rocha e cols., 2004)

Tabela adaptada de Dall e Hariharan (2008).

1.5. Diagnóstico laboratorial utilizado para prevenção de BKVN

O diagnóstico “padrão ouro” para BKVN é realizado através da observação histológica do tecido após a biópsia renal. Os achados histológicos que caracterizam BKVN são a presença alterações citológicas mediadas por vírus nas células do epitélio tubular seguido de infiltrado inflamatório e reação imunoistoquímica positiva com o antígeno SV40 (Drachenberg e cols., 2004). A fim de diminuir a incidência de resultado falso negativo, que pode variar de 10–

36%, é indicado que no ato da biópsia seja coletado pelo menos duas amostras mais centrais contendo preferencialmente tecido medular diminuindo o erro inerente da amostra, uma vez que a nefropatia tem um desenvolvimento focal (Hirsch e Steiger, 2003; Hirsch e cols., 2013). Assim, um resultado de biópsia negativo não descarta a possibilidade de BKVN focal precoce (Hirsch e cols., 2013).

A maior incidência de BKVN ocorre no 6º mês pós-transplante e é precedida de viremia (~4 semanas) e por “*decoy cell*” ou virúria (~12 semanas) (Hirsch e cols., 2005). Assim como método de rastreamento e preventivo para a ocorrência de BKVN são recomendado testes não invasivos como pesquisa de “*decoy cell*” na urina e qPCR na urina e no plasma mensalmente nos primeiros 3 meses e, após, trimestralmente até 2 anos pós transplante (Hirsch e cols., 2013). Esta abordagem pode identificar entre 80–90% dos pacientes em risco de BKVN evitando a perda de função do enxerto (Hirsch e cols., 2013).

Entretanto, novas estratégias de rastreamento já estão sendo utilizadas com sucesso com: citologia urinária a cada 2 semanas nos primeiros 3 meses pós transplante e após mensalmente até o 6º mês e trimestralmente até dois anos após o transplante e se em alguma amostras no exame citológico for positiva avalia-se a viremia por qPCR (Schaub e cols., 2010) ou pesquisa de BKPyV no sangue mensalmente no seis primeiros meses e após trimestralmente até o 2 anos e sempre que tiver aumento na não explicado da creatinina sérica e após tratamento para rejeição aguda (Kasiske e cols., 2010).

1.5.1. Citopatologia urinária

O exame citopatológico da urina observa as alterações celulares, as quais, podem predizer uma infecção ativa por BKPyV. Essas alterações celulares podem ser vistas pela coloração de *Papanicolaou* (Singh e cols., 2006), microscopia com contraste de fase (Fogazzi e cols., 2001) e mais atualmente por microscopia de campo claro sem o uso de coloração (Tesser Poloni e cols., 2011). Essas células são chamadas de “*decoy cells*”. Sua característica morfológica pode apresentar: aumento do núcleo com uma grande inclusão basofílica intranuclear circulado por cromatina fosca ou de aparência gelatinosa; as inclusões nucleares também podem apresentar aspecto vesicular ou cercado por um halo e a cromatina pode apresentar-se aglutinada (Kahan e cols., 1979; Singh e cols., 2006). O uso das *decoy cells* como ferramenta de predição de nefropatia por BK vírus foi estabelecida por Hirsch e cols. (2002), com sensibilidade e especificidade de 100% e 71% respectivamente e valor preditivo positivo (VPP) de 29% e valor preditivo negativo de 100%. Esse último valor tem grande importância pois, uma vez o teste molecular negativo, a suspeita de nefropatia por BKPyV pode ser descartada (Hirsch e cols., 2002). Entretanto, quanto a capacidade de predição de nefropatia da “*decoy cell*”, estudos mais recentes (Viscount e cols., 2007; Nankivell e cols., 2015) mostram valores inferiores aos dados previamente apresentados por Hirsch e cols. (2002).

1.5.2. qPCR em urina e plasma

A determinação quantitativa de BKPyV por técnicas de PCR é muito útil no diagnóstico da infecção, precedendo a ocorrência de nefropatia associada a

este vírus. A virúria precede em 4–12 semanas o desenvolvimento da viremia e da nefropatia (Hirsch e cols., 2005; Hirsch e cols., 2013). O ponto de corte para virúria para predizer BKVN varia de 6–10 *log*/mL (recomenda-se 7 *log* cópias/mL) e tem especificidade de 83–97% (Tabela 2) (Hariharan, 2006; Viscount e cols., 2007; Costa e cols., 2008). Apesar de ser uma ótima ferramenta no rastreamento devido ao seu alto valor preditivo negativo (100%) para BKVN, carece o valor preditivo positivo (~40%) (Hariharan, 2006).

Na quase totalidade dos casos de BKVN a viremia está presente e essa acomete de 10–40% de pacientes transplantados renais; por esse motivo, o uso do qPCR na avaliação da viremia tem se mostrado uma importante ferramenta de busca em pacientes com risco de BKVN, no diagnóstico precoce e presuntivo de BKVN e no controle do tratamento da nefropatia, uma vez que observa-se uma redução da carga viral ao mesmo tempo que se reduz a imunossupressão do paciente (Hariharan, 2006). Atualmente, o ponto de corte na avaliação para alto risco de BKVN, é recomendado o valor de 10.000 cópias/mL (4 *log* cópias/mL) (Hirsch e cols., 2005), entretanto, a literatura mostra diferentes pontos de corte em diversos estudos e especificidade que varia de 69–100% (Tabela 2). Assim, Hassan e cols. (2014), avaliam que o valor de 4 *log*/mL pode subestimar alguns casos de BKVN recomendando que cada centro de diagnóstico estabeleça seu ponto de corte. A *American Society of Transplantation* (AST) e *Infectious Diseases Community of Practice* recomendam que pacientes com viremia persistente ≥ 4 *log*/mL e com ausência de alterações histológicas mediadas por vírus na biópsia devem ser diagnosticados como BKVN presuntiva (Hirsch e cols., 2013).

1.6. Tratamento

O tratamento da infecção do BKPyV visa a eliminação do vírus, preservando a função renal e prevenindo a rejeição aguda ou crônica (Dall e Hariharan, 2008). Atualmente, não existe uma terapia antiviral específica para tratar o BKPyV; a recomendação de reduzir a imunossupressão mantém-se como tratamento de escolha, mesmo que baseada em pequenos estudos (Nickeleit e cols., 2000; Hirsch e cols., 2005; Wadei e cols., 2006; Barraclough e cols., 2011; Pham e cols., 2014; Sawinski e Goral, 2015). Essas recomendações carecem de investigações mais profundas, uma vez que Vasudev e cols. (2005) evidenciaram que a redução da imunossupressão não recobrou a função renal de todos os pacientes que apresentaram diminuição da função renal causada por BKPyV. O risco em diminuir a imunossupressão é ocasionalmente promover um quadro de rejeição aguda (Dall e Hariharan, 2008). Pham e cols. (2014), avaliou agentes imunossupressores e antivirais no combate à infecção por BKPyV, concluindo que ainda é incerta a eficiência dos antirretrovirais e que não há evidências de que nenhum imunossupressor em particular apresente influência sobre outro no risco de desenvolvimento de BKVN, sendo o rastreamento a melhor ferramenta para evitar a nefropatia.

Visto que na literatura não há consenso quanto ao ponto de corte à ser considerado para predição de nefropatia por BKPyV, como observado na tabela 2, foi necessário estabelecermos esses valores de referência para BKVN, observando a população atendida.

1.7. Referências Bibliográficas

Abend, J. R., A. E. Joseph, D. Das, D. B. Campbell-Cecen e M. J. Imperiale. A truncated T antigen expressed from an alternatively spliced BK virus early mRNA. *J Gen Virol.* 2009; 90(Pt 5): 1238-1245.

Awadalla, Y., P. Randhawa, K. Ruppert, A. Zeevi e R. J. Duquesnoy. HLA mismatching increases the risk of BK virus nephropathy in renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2004; 4(10): 1691-1696.

Barraclough, K. A., N. M. Isbel, C. E. Staats e D. W. Johnson. BK Virus in Kidney Transplant Recipients: The Influence of Immunosuppression. *J Transplant.* 2011; 2011: 750836.

Bohl, D. L. e D. C. Brennan. BK virus nephropathy and kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007; 2 Suppl 1: S36-46.

Costa, C., M. Bergallo, S. Astegiano, M. E. Terlizzi, F. Sidoti, G. P. Segolonie cols.,. Monitoring of BK virus replication in the first year following renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2008; 23(10): 3333-3336.

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

Dall, A. e S. Hariharan. BK virus nephritis after renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3 Suppl 2: S68-75.

Dharnidharka, V. R., W. S. Cherikh e K. C. Abbott. An OPTN analysis of national registry data on treatment of BK virus allograft nephropathy in the United States. *Transplantation.* 2009; 87(7): 1019-1026.

Drachenberg, C. B., J. C. Papadimitriou, H. H. Hirsch, R. Wali, C. Crowder, J. Nogueirae cols.,. Histological patterns of polyomavirus nephropathy: correlation with graft outcome and viral load. *Am J Transplant.* 2004; 4(12): 2082-2092.

Drachenberg, C. B., H. H. Hirsch, J. C. Papadimitriou, R. Gosert, R. K. Wali, R. Munivenkatappa cols.,. Polyomavirus BK versus JC replication and nephropathy in renal transplant recipients: a prospective evaluation. *Transplantation.* 2007; 84(3): 323-330.

Elfadawy, N., S. M. Flechner, J. D. Schold, T. R. Srinivas, E. Poggio, R. Faticae cols.,. Transient versus persistent BK viremia and long-term outcomes after kidney and kidney-pancreas transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014; 9(3): 553-561.

Fogazzi, G. B., M. Cantú e L. Saglimbeni. 'Decoy cells' in the urine due to polyomavirus BK infection: easily seen by phase-contrast microscopy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2001; 16(7): 1496-1498.

Gardner, S. D., A. M. Field, D. V. Coleman e B. Hulme. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet.* 1971; 1(7712): 1253-1257.

Gilis, L., S. Morisset, G. Billaud, S. Ducastelle-Lepretre, H. Labussiere-Wallet, F. E. Nicolinie cols.,. High burden of BK virus-associated hemorrhagic cystitis in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2014; 49(5): 664-670.

Ginevri, F., R. De Santis, P. Comoli, N. Pastorino, C. Rossi, G. Bottie cols.,. 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.

Hariharan, S. BK virus nephritis after renal transplantation. *Kidney Int.* 2006; 69(4): 655-662.

Harris, K. F., J. B. Christensen e M. J. Imperiale. 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.

Hart, A., J. M. Smith, M. A. Skeans, S. K. Gustafson, D. E. Stewart, W. S. Cherikhe cols.,. Special Issue: OPTN/SRTR Annual Data Report 2014. *American Journal of Transplantation.* 2014; 16(Supplement S2): 4–215.

Hassan, S., C. Mittal, S. Amer, F. Khalid, A. Patel, R. Delbustoe cols.,. 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(1): 55-60.

Hirsch, H. H., W. Knowles, M. Dickenmann, J. Passweg, T. Klimkait, M. J. Mihatsche cols.,. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med.* 2002; 347(7): 488-496.

Hirsch, H. H. e J. Steiger. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3(10): 611-623.

Hirsch, H. H. BK virus: Opportunity makes a pathogen. *Clinical Infectious Diseases.* 2005; 41(3): 354-360.

Hirsch, H. H., D. C. Brennan, C. B. Drachenberg, F. Ginevri, J. Gordon, A. P. Limayee cols.,. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: Interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation.* 2005; 79(10): 1277-1286.

Hirsch, H. H., P. Randhawa e A. I. D. C. Practice. BK Polyomavirus in Solid Organ Transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2013; 13: 179-188.

Hirsch, H. H., P. Randhawa e A. S. T. I. D. C. o. Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013; 13 Suppl 4: 179-188.

Jiang, M., J. R. Abend, B. Tsai e M. J. Imperiale. Early events during BK virus entry and disassembly. *J Virol*. 2009; 83(3): 1350-1358.

Johannessen, M., M. Walquist, N. Gerits, M. Dragset, A. Spang e U. Moens. BKV agnoprotein interacts with alpha-soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein, and negatively influences transport of VSVG-EGFP. *PLoS One*. 2011; 6(9): e24489.

Johne, R., C. B. Buck, T. Allander, W. J. Atwood, R. L. Garcea, M. J. Imperiale cols.,. Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Arch Virol*. 2011; 156(9): 1627-1634.

Kahan, A., D. Coleman e L. Koss. Activation of Human Polyomavirus Infection—Detection by Cytologic Technics *American Society of Clinical Pathologist*. 1979; 74(3): 326-332.

Kantarci, G., Z. Eren, A. Demirag, I. Dogan, F. Cakalagaoglu e G. Yilmaz. JC virus-associated nephropathy in a renal transplant recipient and comparative analysis of previous cases. *Transpl Infect Dis*. 2011; 13(1): 89-92.

Kasiske, B. L., M. G. Zeier, J. R. Chapman, J. C. Craig, H. Ekberg, C. A. Garveye cols.,. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients: a summary. *Kidney Int*. 2010; 77(4): 299-311.

Kazory, A., D. Ducloux, J. M. Chalopin, R. Angonin, B. Fontaniere e H. Moret. The first case of JC virus allograft nephropathy. *Transplantation*. 2003; 76(11): 1653-1655.

Khamash, H. A., H. M. Wadei, A. S. Mahale, T. S. Larson, M. D. Stegall, F. G. Cosio cols.,. Polyomavirus-associated nephropathy risk in kidney transplants: the influence of recipient age and donor gender. *Kidney Int*. 2007; 71(12): 1302-1309.

Knowles, W. A. Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV). *Adv Exp Med Biol*. 2006; 577: 19-45.

Lautenschlager, I., T. Jahnukainen, P. Kardas, J. Lohi, E. Auvinen, L. Mannonen cols.,. A case of primary JC polyomavirus infection-associated nephropathy. *Am J Transplant*. 2014; 14(12): 2887-2892.

Legendre, C., G. Canaud e F. Martinez. Factors influencing long-term outcome after kidney transplantation. *Transpl Int*. 2014; 27(1): 19-27.

McDonald, S. P. e G. R. Russ. Survival of recipients of cadaveric kidney transplants compared with those receiving dialysis treatment in Australia and New Zealand, 1991–2001. *Nephrol Dial Transplant*. 2002; 17(12): 2212-2219.

Nankivell, B. J., J. Renthawa, N. Jeoffreys, K. Kable, P. J. O'Connell, J. R. Chapman cols.,. Clinical Utility of Urinary Cytology to Detect BK Viral Nephropathy. *Transplantation*. 2015; 99(8): 1715-1722.

Nickeleit, V., H. H. Hirsch, M. Zeiler, F. Gudat, O. Prince, G. Thiele cols.,. BK-virus nephropathy in renal transplants-tubular necrosis, MHC-class II expression and rejection in a puzzling game. *Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15(3): 324-332.

Pahari, A. e L. Rees. BK virus-associated renal problems--clinical implications. *Pediatr Nephrol.* 2003; 18(8): 743-748.

Pascual, M., T. Theruvath, T. Kawai, N. Tolkoff-Rubin e A. B. Cosimi. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med.* 2002; 346(8): 580-590.

Pham, P. T., J. Schaenman e P. C. Pham. BK virus infection following kidney transplantation: an overview of risk factors, screening strategies, and therapeutic interventions. *Current Opinion in Organ Transplantation.* 2014; 19(4): 401-412.

Purighalla, R., R. Shapiro, J. McCauley e P. Randhawa. BK virus infection in a kidney allograft diagnosed by needle biopsy. *Am J Kidney Dis.* 1995; 26(4): 671-673.

RBT (2014). RBT - Registro Brasileiro de Transplante. a.-A. B. d. T. d. Orgãos. <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2014/rbt3-trim-parc.pdf>. 2014.

Rocha, P. N., T. J. Plumb, S. E. Miller, D. N. Howell e S. R. Smith. Risk factors for BK polyomavirus nephritis in renal allograft recipients. *Clin Transplant.* 2004; 18(4): 456-462.

Sawinski, D. e S. Goral. BK virus infection: an update on diagnosis and treatment. *Nephrol Dial Transplant.* 2015; 30(2): 209-217.

Schaub, S., H. H. Hirsch, M. Dickenmann, J. Steiger, M. J. Mihatsch, H. Hopfer e cols.,. Reducing immunosuppression preserves allograft function in presumptive and definitive polyomavirus-associated nephropathy. *Am J Transplant.* 2010; 10(12): 2615-2623.

Siguiet, M., P. Sellier e J. F. Bergmann. BK-virus infections: a literature review. *Med Mal Infect.* 2012; 42(5): 181-187.

Singh, H. K., L. Bubendorf, M. J. Mihatsch, C. B. Drachenberg e V. Nickenleit (2006). Urine Cytology Findings of Polyomavirus Infections. *Polyomaviruses and Human Diseases*. F. Nasimul Ahsan M.D., Springer New York. **577**: 201-212.

Smith, J. M., R. A. McDonald, L. S. Finn, P. J. Healey, C. L. Davis e A. P. Limaye. Polyomavirus nephropathy in pediatric kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2004; 4(12): 2109-2117.

Stratton, K., D. A. Almario e M. C. McCormick (2002). Immunization Safety Review: SV40 Contamination of Polio Vaccine and Cancer. <http://www.nap.edu/catalog/10534.html>, Institute of Medicine (US) Immunization Safety Review Committee.

Suthanthiran, M. e T. B. Strom. Renal transplantation. *N Engl J Med*. 1994; 331(6): 365-376.

Tesser Poloni, J. A., R. Mussoi Bruno e C. Franco Voegeli. Common digital camera and urinary sediment analysis: a tool to be explored. *NDT Plus*. 2011; 4(6): 455-456.

Urbano, P. R. P. (2013). Incidência, caracterização genotípica e determinação da dinâmica de excreção dos poliomavírus humanos em amostras de urina de indivíduos saudáveis. Mestre, Universidade de São Paulo.

Vasudev, B., S. Hariharan, S. A. Hussain, Y. R. Zhu, B. A. Bresnahan e E. P. Cohen. BK virus nephritis: risk factors, timing, and outcome in renal transplant recipients. *Kidney Int*. 2005; 68(4): 1834-1839.

Viscount, H. B., A. J. Eid, M. J. Espy, M. D. Griffin, K. M. Thomsen, W. S. Harmsene cols.,. Polyomavirus polymerase chain reaction as a surrogate

marker of polyomavirus-associated nephropathy. *Transplantation*. 2007; 84(3): 340-345.

Wadei, H. M., A. D. Rule, M. Lewin, A. S. Mahale, H. A. Khamash, T. R. Schwabe cols.,. Kidney transplant function and histological clearance of virus following diagnosis of polyomavirus-associated nephropathy (PVAN). *Am J Transplant*. 2006; 6(5 Pt 1): 1025-1032.

Wollebo, H. S., M. K. White, J. Gordon, J. R. Berger e K. Khalili. Persistence and pathogenesis of the neurotropic polyomavirus JC. *Ann Neurol*. 2015.

Yan, Y., T. Stehle, R. C. Liddington, H. Zhao e S. C. Harrison. Structure determination of simian virus 40 and murine polyomavirus by a combination of 30-fold and 5-fold electron-density averaging. *Structure*. 1996; 4(2): 157-164.

Zalona, A. C., G. S. Lopes, C. G. Schrago, R. T. Goncalves, M. G. Zalis e R. B. Varella. Molecular characterization of BK polyomavirus subtypes in renal transplant recipients in Brazil. *J Med Virol*. 2011; 83(8): 1401-1405.

Zhong, S., P. S. Randhawa, H. Ikegaya, Q. Chen, H. Y. Zheng, M. Suzuki cols.,. 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.

Tabela 2. Pontos de corte para virúria e viremia (*log* cópias/mL) em diferentes estudos.

Autor e ano da publicação	Ponto de corte		Sens. no plasma	Especif. no plasma	Sens. na urina	Especif. na urina
	plasma (<i>log</i>)	urina (<i>log</i>)				
Hirsch e cols., 2002	3,9	–	100	88,0	–	–
Randhawa e cols., 2004	3,7	7,0	100	93,0	100	96,0
Viscount e cols., 2007	4,2	7,4	100	96,0	100	92,0
Costa e cols., 2008	4,2	–	100	99,6	–	–
Sung e cols., 2008	4,5	5,9	100	96,4	100	96,4
Boudreault e cols., 2009	3,5	–	100	89,6	–	–
Pollara e cols., 2011	4,1	–	94,9	100	–	–
Girmanova e cols., 2011	3,0	7,8	100	69,0	100	83,0
Miller e cols., 2012	4,0	7,5	100	87,5	100	85,0
Chung e cols., 2012	4,0	10,0	100	97,4	100	91,8
Kudose e Dong, 2014	3,7	7,2	100	97,6	100	97,5
Nankivell e cols., 2015	3,0	–	96,3	90,3	–	–

Legenda: Especif, Especificidade; Sens, Sensibilidade.

Tabela adaptada de Kudose e Dong (2014).

2. Objetivo

2.1. Objetivo geral

Determinar os pontos de corte de virúria e viremia por BKPyV, bem como os pontos de corte de nefropatia por BKPyV, em coortes de pacientes submetidos a transplante renal.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Determinar a incidência de virúria por BKPyV em transplantados bem como o momento da ocorrência da mesma;

2.2.2. Determinar a incidência de viremia por BKPyV, bem como o momento da ocorrência da mesma, na população supracitada;

2.2.3. Determinar a incidência de nefropatia associada ao BKPyV, em transplantados de rim;

2.2.4. Caracterizar os fatores de risco para virúria, viremia e nefropatia por BKPyV, em transplantados de rim;

2.2.5. Realizar uma revisão sistemática da literatura sobre métodos de diagnóstico não invasivos comparados com a biópsia para diagnóstico de nefropatia por BKPyV;

2.2.6. Determinar o impacto de métodos de extração e de compartimentação de BKPyV em amostras de urina;

3. Artigos Científicos

3.1. Evaluation of different urine protocols and DNA extraction methods for quantitative detection of BK viruria in kidney transplant patients

Gabriel Godinho Pinto

José Antonio Tesser Poloni

Lilian Carla Carneiro

Ludmila Fiorenzano Baethgen

Afonso Luís Barth

Alessandro Comarú Pasqualotto

Publicado no *Journal of Virological Methods* (2013).



Short communication

Evaluation of different urine protocols and DNA extraction methods for quantitative detection of BK viruria in kidney transplant patients

Gabriel Godinho Pinto^a, José Antonio Tesser Poloni^{a,b}, Lilian Carla Carneiro^a, Ludmila Fiorenzano Baethgen^a, Afonso Luís Barth^{c,d}, Alessandro Comarú Pasqualotto^{a,e,*}

^a Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA), Porto Alegre, Brazil

^b Central Laboratory, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

^c Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

^d Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

^e Molecular Biology Laboratory, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

A B S T R A C T

Article history:

Received 31 August 2012

Received in revised form 4 December 2012

Accepted 6 December 2012

Available online xxx

Keywords:

BKV

Diagnosis

Kidney transplantation

Polyomavirus

Real-time polymerase chain reaction

Most transplant centers screen kidney transplant recipients for BK virus (BKV) infection using molecular techniques for the virus load determination. However, there is no consensus about the pre-analytical methods involved in the viral detection. In this study BK viral load was compared by the means of two urine treatment protocols (pelleted vs. whole urine) and two commercial DNA extraction kits for a quantitative PCR (qPCR) experiment. Ten patients who presented decoy cells in their urine sediment were selected for the study. Viral load was considerable higher (>1.5 log) for pelleted urine, in comparison to whole urine but no significant difference was observed between the extraction kits. PCR inhibition did not occur by using pelleted urine. In order to increase test sensitivity to detect BK viruria, pelleted urine should be the preferred urine compartment for qPCR experiments.

© 2013 Published by Elsevier B.V.

The polyomavirus BK (BKV) has been regarded as one of the key agents that can lead to loss of graft function in patients who have undergone kidney transplantation. BKV is the leading infectious cause of graft loss occurring in the first 5 years after transplantation (Bechert et al., 2010). The prevalence of BKV reactivation after kidney transplantation varies from 1 to 10% and the allograft loss due to BKV range from 10% to more than 80% (Hirsch et al., 2005). Currently, the gold standard for the diagnosis of BKV nephropathy is kidney biopsy, however when a positive result is obtained the kidney may already have suffered irreversible injury. Molecular biology may allow early detection of BKV, in a time frame in which clinicians can still alter the patient immunosuppression regime, potentially avoiding the occurrence of late-stage renal disease (Bechert et al., 2010).

It is well known that BK viruria may precede viremia and BKV nephropathy by several weeks (Koukoulaki et al., 2009) and, therefore, the detection of BK in urine is of paramount importance in transplant patients. However, there is no consensus about the

pre-analytical methods involved in the viral detection. Furthermore, it is necessary to establish the ideal urine compartment to be analyzed (i.e., whole urine versus a pelleted sample) (Behzadbehbahani et al., 1997; Si-Mohamed et al., 2006; Mitterhofer et al., 2010; Anzivino et al., 2011; Pires et al., 2011). In this study, two urine treatment protocols and two commercial extraction kits for the detection of BK viruria in kidney transplant patients were compared.

Urine samples from 10 patients attending a referral transplant center in Southern Brazil were used in this study. These samples were selected based on the presence of decoy cells in urine sediment by bright field microscopy. Samples were collected in sterile flasks without preservatives and shipped to the Molecular Biology Laboratory where they were refrigerated at 4 °C until processed for DNA extraction. DNA was extracted from urine samples on the same day of sample collection by using two commercial kits: QIAmp DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) – from now on referred to as kit 1; and QIAmp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) – kit 2. Kits for tissue have been used in the literature to extract BKV DNA from urine samples (Mitterhofer et al., 2010; Anzivino et al., 2011), whilst kit 2 has been recommended by the manufacturer for such purpose (QIAGEN, 2010). For each DNA purification kit, two urine preparations were tested: whole urine and urine pellet of centrifuged sample.

* Corresponding author at: Molecular Biology Laboratory, ISCMPA, Av Independência 155, Hospital Dom Vicente Scherer, 8 andar, Porto Alegre 90035-075, Brazil. Tel.: +55 51 99951614; fax: +55 51 32137491.

E-mail address: acpasqualotto@hotmail.com (A.C. Pasqualotto).

Table 1BK urinary viral load (copies per ml of urine) obtained by the means of two commercial DNA extraction kits and two urine compartments ($n = 10$).

	Whole urine	Urinary pellet	<i>p</i> value
Kit 1 QIAmp DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen)	1.299×10^{10}	5.676×10^{11}	0.003
Kit 2 QIAmp Viral RNA Kit (Qiagen)	1.107×10^{10}	4.285×10^{11}	0.002
<i>p</i> value	1.000	0.472	

When whole urine was tested, the sample was homogenized and a volume of 140 μ l and 220 μ l were used as initial sample, as recommended by the manufacturer, respectively, for DNA extraction kits 1 and 2.

For pelleted urine, DNA extraction proceeded as follows. For kits 1 and 2, 10 ml of homogenized urine was transferred to a sterile falcon tube and centrifuged at 3500 rpm for 10 min. The supernatant was discarded and a pellet of 140 μ l for kit 1 and 220 μ l for kit 2 was used as recommended by the manufacturer.

Extracted DNA samples were stored at -80°C for later quantitative polymerase chain reaction (qPCR) testing. The CPE-DNA Internal Control (Nanogen, Buttigliera Alta, Italy) was added in each of the extracted DNA samples, as recommended by the manufacturer. The internal control was the human β -globin gene, which was amplified simultaneously with the target sequence.

BKV DNA detection was performed by qPCR using a commercial kit (BKV Q-PCR Alert Ampliprobe, Nanogen, Buttigliera Alta, Italy) in a 7500 thermal cycler qPCR System (Applied Biosystems). The following cycling steps were used: pre-holding stage 2 min at 50°C , initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of 95°C for 1 min and 60°C for 1 min. The standard curve for this quantitative amplification assay was obtained using BKV Q-PCR Standard (Nanogen, Buttigliera Alta, Italy), containing four known concentrations of BKV DNA (10^2 – 10^5 plasmid copies in 10-fold dilution steps). Results were read by comparing the cycle threshold (Ct) from the unknown sample with the standard controls. In addition to the positive controls, in every run a negative BKV control as well as an internal control was added to the reaction.

Descriptive statistics were used to summarize the data. Variables were treated with Wilcoxon test with an internal confidence of 95%. *p* values of ≤ 0.05 were considered statistically significant and data analysis was performed using the SPSS 16 software (IBM). The study was approved by the Institutional Review Board (protocol numbers 3531/11 and 915/12), and followed the guidelines and regulatory standards for research involving human subjects of the Brazilian National Health Council (Resolution CNS/196).

The number of copies of BKV DNA detected by qPCR varied markedly when the two urine compartments were compared. The average difference between pelleted urine and whole urine was 1.64 log for kit 1 ($p = 0.003$), and 1.59 log for kit 2 ($p = 0.002$). There was no significant difference when comparing the same urine compartment between both commercial DNA extraction kits (magnitude of difference was 0.07 log [$p = 1.000$] for whole urine and 0.12 log [$p = 0.472$] for urine pellet) – Table 1.

There is a general agreement that the presence of BKV DNA should be screened in kidney transplant patients, preferably using quantitative molecular tests. Although the detection of BKV in the blood may better predict BKV nephropathy, many studies recommend performing BKV screening using urinary samples, since viruria may precede viremia by several weeks (Si-Mohamed et al., 2006; Koukoulaki et al., 2009). Even though different protocols have been used in the literature to detect BKV DNA in the urine, no previous investigation has evaluated variations in BK viral load according to different DNA extraction methods and urine protocols. Different extraction methods have been published which include DNA extraction from a volume of 1 ml of urine (Anzivino et al., 2011), performing a concentration step before DNA extraction (Elfaitouri et al., 2006), testing whole urine (Pang et al., 2007), and urinary

pellet (Pires et al., 2011). Furthermore, BKV DNA has been extracted from the urine using different commercial kits, including Qiagen QIAmp Blood and Tissue Kit (Anzivino et al., 2011), Qiagen QIAmp DNA Mini Kit (Pang et al., 2007), Invitrogen PureLink Viral RNA/DNA Kit (Pires et al., 2011), and Qiagen Viral RNA Mini kit (Elfaitouri et al., 2006). In this study, it was demonstrated that the choice of the urinary compartment is very important because different urine protocol showed distinct BK viral loads, whilst the use of different DNA extraction kits had a minor influence in quantitative results.

This study showed that the urinary pellet presents a considerable higher BK viral load when compared with the urine that was only homogenized. The magnitude of difference between pelleted and whole urine was greater than 1.5 log for both DNA extraction kits. Therefore, the use of pelleted urine increases the sensitivity of the method to detect BKV, which may be of particular interest for patients with a low BK viral load. These results are in accordance with the findings by Drachenberg et al. (2001), who showed that BK virions were observed mainly in the cell interior. Therefore, using urine pellet as primary material has the potential to detect higher concentrations of BKV in the clinical sample. A potential disadvantage of pellets relies on the increased concentration of PCR inhibitors, a problem that did not occur in this investigation.

One of the main limiting factors for this study was the small number of samples evaluated. Increasing the number of comparisons could potentially show a significant variation between DNA extraction kits, which is something that deserves additional investigation. Since only patients who were known to have decoy cells in the urine were included in the study the number of BKV copies was very high. For such patients, the difference in BK viral load observed between pelleted and whole urine may have no clinical relevance, which is probably not the case of patients with low BK viral loads.

In conclusion, this study has demonstrated that pre-analytical variables such as the urine protocol chosen for DNA extraction may markedly influence BK viral load detected by qPCR. A standardized method for processing samples for BKV detection is ultimately required.

Acknowledgement

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) – PRONEM 003/2011.

References

- Anzivino, E., Bellizzi, A., Mitterhofer, A.P., Tinti, F., Barile, M., Colosimo, M.T., Fioriti, D., Mischitelli, M., Chiarini, F., Ferretti, G., Taliani, G., Pietropaolo, V., 2011. Early monitoring of the human polyomavirus BK replication and sequencing analysis in a cohort of adult kidney transplant patients treated with basiliximab. *Virol. J.* 8, 407.
- Bechert, C.J., Schnadig, V.J., Payne, D.A., Dong, J., 2010. Monitoring of BK viral load in renal allograft recipients by real-time PCR assays. *Am. J. Clin. Pathol.* 133, 242–250.
- Behzadbehbahani, A., Klapper, P.E., Vallely, P.J., Cleator, G.M., 1997. Detection of BK virus in urine by polymerase chain reaction: a comparison of DNA extraction methods. *J. Virol. Methods* 67, 161–166.
- Drachenberg, R.C., Drachenberg, C.B., Papadimitriou, J.C., Ramos, E., Fink, J.C., Wali, R., Weir, M.R., Cangro, C.B., Klassen, D.K., Khaled, A., Cunningham, R., Bartlett, S.T., 2001. Morphological spectrum of polyoma virus disease in renal allografts: diagnostic accuracy of urine cytology. *Am. J. Transplant.* 1, 373–381.
- Elfaitouri, A., Hammarin, A.L., Blomberg, J., 2006. Quantitative real-time PCR assay for detection of human polyomavirus infection. *J. Virol. Methods* 135, 207–213.

- Hirsch, H.H., Brennan, D.C., Drachenberg, C.B., Ginevri, F., Gordon, J., Limaye, A.P., Mihatsch, M.J., Nicleleit, V., Ramos, E., Randhawa, P., Shapiro, R., Steiger, J., Suthanthiran, M., Trofe, J., 2005. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation* 79, 1277–1286.
- Koukoulaki, M., Grispou, E., Pistolas, D., Balaska, K., Apostolou, T., Anagnostopoulou, M., Tseleni-Kotsovoli, A., Hadjiconstantinou, V., Paniara, O., Saroglou, G., Legakis, N., Drakopoulos, S., 2009. Prospective monitoring of BK virus replication in renal transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis.* 11, 1–10.
- Mitterhofer, A.P., Pietropaolo, V., Barile, M., Tinti, F., Fioriti, D., Mischitelli, M., Limonta, A., Mecule, A., Ferretti, G., Poli, L., Chiarini, F., Berloco, P.B., Taliani, G., 2010. Meaning of early polyomavirus-BK replication post kidney transplant. *Transplant. Proc.* 42, 1142–1145.
- Pang, X.L., Doucette, K., LeBlanc, B., Cockfield, S.M., Preiksaitis, J.K., 2007. 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.* 45, 3568–3573.
- Pires, E.P., Bernardino-Vallinoto, C.V., Alves, D.M., Migone, S.R., Machado, L.F., Ishak, M.O., Ishak, R., Cayres-Vallinoto, I.M., Vallinoto, A.C., 2011. Prevalence of infection by JC and BK polyomaviruses in kidney transplant recipients and patients with chronic renal disease. *Transpl. Infect. Dis.* 13, 633–637.
- QIAGEN, 2010. QIAamp Viral RNA Mini Handbook. QIAGEN, USA.
- Si-Mohamed, A., Goff, J.L., Desire, N., Maylin, S., Glotz, D., Belec, L., 2006. Detection and quantitation of BK virus DNA by real-time polymerase chain reaction in the LT-ag gene in adult renal transplant recipients. *J. Virol. Methods* 131, 21–27.

3.2. Analysis of diagnosis methods as a screening test to detect BK virus nephropathy in kidney transplant patients

Gabriel Godinho Pinto

Jose Antonio T Poloni

Liane N Rotta

Raymund R. Razonable

Alessandro C Pasqualotto

Publicado no Jornal Brasileiro de Nefrologia

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

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

Authors

Gabriel Godinho Pinto ¹
 Jose Antonio T Poloni ^{1,2}
 Liane N. Rotta ¹
 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.

Submitted on: 09/20/2015.

Approved on: 04/11/2016.

Correspondence to:

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

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.

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.

INTRODUCTION

Kidney transplantation is the treatment of choice for many end-stage renal diseases that would otherwise require dialysis and renal replacement therapy.¹ One of the main threats for graft survival is infection caused by the polyomavirus BK (BKV). The prevalence of clinically significant BKV reactivation after kidney transplantation varies, depending on the study, from 1 to 10% and the incidence of allograft loss due to BKV have ranged from as low as 10% to more than 80% of patients with clinically significant BKV

infection.² Rapid and sensitive detection of BKV infection, either in urine or plasma, can lead to early management strategy that is critical to prevent irreversible kidney damage and loss.

The diagnosis of BKV nephropathy requires allograft biopsy,³ however, it may be too late to reverse the damage. Studies have shown that cytological abnormalities ('decoy cells') and polyomavirus DNA are detected in the urine several weeks before kidney damage occurs.^{2,4} Decoy cells may be observed in the urinary sediment as a result of renal and urothelial cells infected by BKV.⁵

Despite being a relatively inexpensive test, the detection of decoy cells requires considerable expertise and these are not specific for BKV infection.^{6,7} Detection and quantitation of BKV DNA can be performed using real time real time polymerase chain reaction (qPCR). While it is comparatively more expensive, in comparison to urine cytopathology, the BKV qPCR has the potential for higher test sensitivity, better linearity and independence from personal expertise for accurate results.

In this systematic review, we searched for studies that directly compared the analytical performance of urine cytopathology and qPCR, for predicting the diagnosis of BKV-associated nephropathy, as proven by histopathology.

MATERIAL AND METHODS

CRITERIA FOR CONSIDERING STUDIES FOR THIS REVIEW

We selected for inclusion in this review studies involving patients who had undergone kidney transplantation not combined with receipt of other transplanted organs.

TYPES OF STUDIES

Cross section, prevalence and cohort studies were included. Studies involving 10 or less patients were not included.

TYPES OF PARTICIPANTS

Adult (≥ 18 years old) renal transplant recipients were considered for study, regardless of sex, race, or nationality.

TYPES OF INTERVENTIONS

Since biopsy is gold standard test for BKV nephropathy, we included only studies that compared biopsies with urine cytology and/or qPCR.

TYPES OF OUTCOME MEASURES

The outcome measure was nephropathy caused by BKV, as confirmed by renal biopsy. Additional information such as BKV viral load in plasma and urine; presence of 'decoy cells' on urine cytopathology; use of SV40 antibody staining on biopsied tissue was investigated and associated with the outcome.

SEARCH STRATEGY

We searched PubMed electronic database using the strategy demonstrated in Table 1. The search was

conducted on 14th February 2014 and included all papers retrieved in the database.

EXCLUSION CRITERIA

Papers that were not written in English and/or not conducted in humans were excluded. Since this study aimed for a comparison of diagnostic tests, we excluded review articles, case reports, studies involving patients younger than 18 years old, studies of patients submitted to transplant procedures other than renal transplantation (even when combined), drug intervention studies, studies in which biopsies were not performed to confirm nephropathy and studies that did not compare biopsies with at least one of the tests under study. Attempts were made to contact corresponding authors when articles were not available on Pubmed or when additional information was required. In the situations when a response was not received, the respective articles were excluded.

STUDIES INCLUDED IN THE REVIEW AND DATA SYNTHESIS

The flow-chart diagram in Figure 1 shows the total number of papers screened and number of manuscripts that met the inclusion criteria. Additional data were extracted from these studies.

ETHICAL ASPECTS

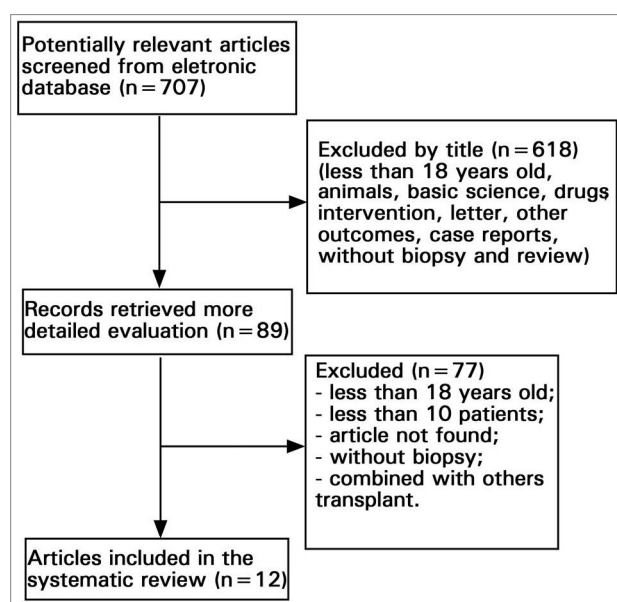
The study was approved by the Institutional Review Board (protocol numbers 3531/11 and 915/12).

RESULTS

The systematic search initially identified 707 potential articles. However, a total of 12 articles were included in the final analyses. A total of 1694 renal transplant recipients were included in this review (Table 2). Using biopsy as gold standard there were 115 cases (6.8%) of presumptive nephropathy without observation of BKV and 57 cases (3.4%) of polyomavirus-associated nephropathy (PVAN). The range of sensitivity, specificity, PPV (positive predictive (PPV) value) and NPV (negative predictive (NPV) value) using qPCR as non-invasive test to detect and predict PVAN in plasma was 60-100%, 33-100%, 7-65% and 72-100% respectively (Table 3). The range of plasma viral load at the time of diagnosis was 2.7 - 7 log. The threshold of ≥ 3.7 log for PVAN provide specificity of 91% and positive predicted value (PPV) of 29%, whereas > 4.2 log

TABLE 1 SEARCH STRATEGY USED IN THE STUDY (PubMed)

(humans)
AND
((transplant) OR (graft survival[mh]) OR ("graft survival") OR (graft rejection[mh]) OR ("graft rejection"))
AND
((kidney[mh]) OR (kidney) OR ("allograft loss") OR (kidney disease[mh]) OR ("kidney disease"))
AND
((molecular diagnostic techniques[mh]) OR ("molecular diagnostic techniques") OR (molecular biology[mh]) OR ("molecular biology") OR ("molecular biology") OR (PCR) OR ("polymerase chain reaction") OR ("polymerase chain reaction") OR (polymerase chain reaction[mh]) OR (cytological techniques[mh]) OR ("cytological techniques") OR ("decoy cells") OR (papanicolaou) OR (biopsy) OR (viremia) OR (viruria) OR ("viral load"))
AND
("BK virus") OR (polyomavirus infection[mh]) OR ("polyomavirus infection") OR (polyomavirus) OR ("BK nephropathy"))

Figure 1. Flow-chart of article screened.

enhanced the specificity to 96% and PPV to 50%. Sensitivity and NPV were 100% in both cases.⁸ In those studies where cytology test were performed (n = 506 patients), decoy cells were found in 30.6% (n = 155) of the patients. In comparison with qPCR, decoy cells showed better range on NPV (97-100%), while sensitivity, specificity and PPV were diminished (Table 4). In one study, the BKV replication indicated by decoy cell shedding in urine, BKV viremia (qPCR), and PVAN (histopathology) occurred in 29%, 13%, and 6% respectively, and the median time for detection was 3.7 months, 5.4 months and 6.5 months after transplant, respectively.² In all studies range time for the detection of viruria, decoy cell and viremia were 0.03-12 month, 0.5-16.1 month and 0.9-25 month after transplant respectively. The early (day 5) detection of BKV viruria may predict the

occurrence of both BKV viremia and nephropathy.⁹ Also, the finding of two or more consecutively positive urine samples was shown to be a helpful tool to predict BKV viremia (sensitivity 100%; specificity 94%; positive and negative predictive values of 50% and 100%, respectively).¹⁰ It was demonstrated that 20% patients became viremic when BKV copies in the urine achieved 7 log/mL - a percentage that increased to 33%, 50% and 100% at 8 log, 9 log and ≥ 10 log, respectively.¹¹ Such an association has not been demonstrated for decoy cells.

DISCUSSION

This study shows the paucity of data in the literature regarding the comparison of the performance of qPCR (either blood or urine) and urine cytopathology for the diagnosis of PVAN. It seems clear that viruria (defined as detection of BKV DNA in the urine) precedes the detection of decoy cells on urinary cytology, which antecedes viremia and PVAN.² Detection of decoy cells and BKV viruria are important markers of BKV replication but poor predictors of PVAN.

The cut-off to determine the clinical relevance of BKV viremia remains controversial. The American Society of Transplantation (AST) recommends that in the presence of plasma loads > 4 log for three or more weeks the diagnosis PVAN should be presumed and biopsy should be considered for definitive diagnosis.¹² While the American Society of Transplantation and the Kidney Disease Improving Global Outcomes Group suggest a BK viral load of 4 log copies (10.000 copies) as a cut-off value for PVAN, there is no US Food and Drug Administration approved or standardizes methods for BK viral load evaluation. The diagnosis of BKV is currently based on different

TABLE 2 PROSPECTIVE STUDIES THAT COMPARED qPCR, URINE CITOTOLOGY AND KIDNEY BIOPSY IN THE DIAGNOSIS OF PVAN IN KIDNEY TRANSPLANT RECEPTORS

Author	n	Decoy cells ^a	Viremia (n)	Viral Load (plasma)	Presumptive 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	Median 2.84 (0-5.86)	0	8
Thamboo <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	Mean 5.9 (range 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	Mean 5.5 log (range, 3.6 - 6.5)	10	2
Knight <i>et al.</i> ²¹	349	NA	57	5.7 log (SD ± 5.9)	17	15
Menter <i>et al.</i> ²³	52	52	17	> 7 log	16	1

^a Number of patients diagnosed with decoy cells on cytopathology; ^b Number of patients with diagnosis of nephropathy but with no visualization of BKV by SV40 or viral alterations characteristics; ^c Mean peak of viral load; NA: Not applicable; PVAN: Polyomavirus-associated nephropathy; sd: Standard deviation.

TABLE 3 PERFORMANCE OF BKV VIREMIA DETECTED BY qPCR IN THE PREDICTION OF PVAN

Author	Molecular target	Primer or probe	Sequence (5'-3')	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Hirsch <i>et al.</i> ²	NI	Primer 1,	AGCAGGCAAGGG TTCTATTACTAAAT	100	88	50	100
		Primer 2,	GAAGCAACAGCA GATTCTCAACA				
Pang <i>et al.</i> ¹¹	VP1 gene	Probe	AAGACCCTAAAGACTTT CCCTCTGATCTACA CCAGTTT labeled with 6-carboxyfluorescein at the 5' end and 6-carboxytetramethylrhodamine at the 3' end	60	76	65	72
		BKpangF	ATGTGACCA ACACAGC				
		BKpangR	CTG TGCCATCAAACACC				
		BKpangP1	AGGAGAACCCAGA GAGTGGA- fluorescein				
Thamboo <i>et al.</i> ²⁸	VP1 gene	BKpangP2	LC-Red 640-GGCAGCCTATGT ATGGTATGGAA-phosphate (5'-AGG TAG AAG AGG TTA GGG TGT TTG ATG GCA CAG-3') dual-labeled at the 5' end with 6-carboxyfluorescein (FAM) and the 3' end with 6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA)	67	33	20	80
		NI					
Viscount <i>et al.</i> ⁸	VP2 gene	Primer PoL1s,	CACTTTTGGGGGACCTAGT	100	96	50	100
		Primer PoL2as,	CTCTACAGTAGCA AGGGATGC				
		Probe 1, PoLP1,	TCTGAGGCTGCTGCT GCCACAGGATTTT-fluorescein				
		Probe 2, PoLP2,	LC-Red 640-AGTAG CTGAAATTGCTG CTGGAGAGGCTGCT-phosphate				

CONTINUED TABLE 3.

Almerás <i>et al.</i> ²⁴	VP2 gene	Primer PoL1s,	CACTTTTGGGGGACCTAGT	100	91	15	100
		Primer PoL2as,	CTCTACAGTAGCAAGGGATGC				
		Probe 1, PoLP1,	TCTGAGGCTGC TGCTGCCA CAGGATTTT-fluorescein				
		Probe 2, PoLP2,	LC-Red 640-AGTAGCTG AAATTGCTGC TGGAGAGGCTGCT- phosphate				
Babel <i>et al.</i> ¹⁰	VP1 gene	NI	NI	100	96	43	100
Girmanova <i>et al.</i> ²⁹	Gene that encode large T Ag	Commercial kit	BKV Q-PCR Detection Alert Kit (Chemagen)	100	68	7	100
Pollara <i>et al.</i> ¹⁶	Gene that encode large T Ag	Commercial kit	BKV Q.Alert Kit (Nanogen Advanced Diagnostics, Italy)	95	100	NI	NI
Saundh <i>et al.</i> ⁹	Gene that encode large T Ag	BKV Forward	TGA CTA AGA AAC TGG TGT AGA TCA	100	91	17	100
		BKV Reverse	YTCC TT TAAT GA AAA ATG GGA				
		BKV Probe	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
		Primer 1, Primer 2,	AGCAGGCAAGGGTCTATTACTAAAT GAAGCAACAGCAGATTCTCAACA AAGACCCTAAAGACTTTCCCTCTGAT CTACACCAGTTT labeled with 6-carboxyfluorescein at the 5' end and 6-carboxytetramethylrhodamine at the 3' end	100	57	41	100
Menter <i>et al.</i> ²³	NI	Probe					

Ag: Antigen; BKV: BK virus; NI: Not informed; NPV: Negative Predictive Value; PPV: Positive Predictive Value; PVAN: Polyomavirus-associated nephropathy.

TABLE 4 PERFORMANCE OF URINE CYTOPATHOLOGY IN THE PREDICTION OF PVAN

Author	Decoy cell (n)	PVAN (n)	Sensitivity	Specificity	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

NPV: Negative Predictive Value; PPV: Positive Predictive Value; PVAN: Polyomavirus-associated nephropathy.

qPCR approaches, but since there is no standard method for BKV viral load assessment, it is essential that institutions implement clinical validation studies certifying their own methodology to be used as a guide for clinical treatment.^{2,13-19}

The definitive PVAN diagnosis is made histopathologically²⁰ in a context in which the viral infection may be difficult to differentiate from organ rejection. In our review, only four articles reported the use of SV40 staining in the histopathological

test.²¹⁻²⁴ Therefore, the absence of a confirmatory test may underestimate the actual frequency of PVAN. The SV40 should be performed when clinicians suspect of BKV infection, despite the absence of visible alterations on the examined tissue.²⁵ The AST recommends a minimum of two core biopsies with medullary tissue preferable in an intention to decrease the false negative diagnosis of PVAN, which can be as high as 20-30% (12, 26). Therefore, a negative biopsy does not rule out PVAN.²⁶

CONCLUSION

This study demonstrates the paucity of data in the literature on the comparison of diagnostic tests for the prediction of PVAN. qPCR has an overall better diagnostic performance than urine cytopathology for the detection of PVAN. However, the cut-off for qPCR tests remain poorly defined. In contrast to cytomegalovirus (CMV), for which the World Health Organization has produced international standards,²⁷ there is a need for standardization for BKV-related tests. Additional prospective studies are ultimately required in order to elucidate the ideal cut-off for viral load in the plasma and urine, for the early diagnosis of PVAN, as well as the moment for occurrence of viremia, and co-factors associated with the transplant recipient.

ACKNOWLEDGEMENTS

The different techniques limit the comparison between qPCR assays included, once there is no international standard for BKV quantification.

Funding: This study was funded by FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul), a Brazilian governmental research agency.

REFERENCES

- 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>
- Traustman 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>
- Babel N, Fendt J, Karaivanov S, Bold G, Arnold S, Sefrin 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>
- 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>
- 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>
- 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
- 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>
- 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.
- Hassan S, Mittal C, Amer S, Khalid F, Patel A, Delbusto R, et al. Currently recommended BK virus (BKV) plasma viral load cutoff of ≥ 4 log₁₀/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>
- 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
- 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>
- 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>
- 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>
- Helanterä I, Ortiz F, Auvinen E, Räsänen-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>

3.3. Quantitative detection of BK virus in kidney transplant recipients: a prospective validation study

Gabriel Godinho Pinto

Diego D'Avila Paskulin

José Antonio Tesser Poloni

Nadiana Inocente

Fabio Spuldaro

Regina Barbosa Schroeder

Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado

Fernanda de Paris

Nailí Moreira

Afonso Luís Barth

Roberto Ceratti Manfro

Elizete Keitel

Alessandro Comarú Pasqualotto

Enviado para publicação na Revista *Transplant Infectious Disease*.



Quantitative detection of BK virus in kidney transplant recipients: a prospective validation study

Journal:	<i>Transplant Infectious Disease</i>
Manuscript ID	TID-16-O-100
Wiley - Manuscript type:	Original Report
Date Submitted by the Author:	22-Aug-2016
Complete List of Authors:	PINTO, Gabriel; Universidade Federal de Ciencias da Saude de Porto Alegre, PPG - Patologia Paskulin, Diego ; Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil Poloni, José Inocente, Nadiana Spuldaro, Fabio ; Hospital de Clinicas de Porto Alegre Schroeder, Regina; Santa Casa de Misericordia de Porto Alegre Machado, Alice; Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Biomedical Research Laboratory de Paris, Fernanda; Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Biomedical Research Laboratory Moreira, Nailí; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Barth, Afonso; Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS) Manfro, Roberto; Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Nefrologia Keitel, Elizete Pasqualotto, Alessandro; Irmandade Santa Casa de Misericória Hospital Complex in Porto Alegre
Keywords:	Kidney transplantation, PCR, polyomavirus, viremia, viruria

Quantitative detection of BK virus in kidney transplant recipients: a prospective validation study

AUTHORS NAMES AND AFFILIATIONS

¹ Gabriel Godinho Pinto

² Diego D'Avila Paskulin

^{1,2} José Antonio Tesser Poloni

¹ Nadiana Inocente

³ Fabio Spuldaro

² Regina Barbosa Schroeder

³ Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado

³ Fernanda de Paris

³ Naili Moreira

³ Afonso Luís Barth

³ Roberto Ceratti Manfro

^{1,2} Elizete Keitel

^{1,2} Alessandro C. Pasqualotto

For Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 ¹ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre,
4
5 Brazil;

6
7
8 ² Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil;

9
10 ³ Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.
11
12
13
14
15

16 **Corresponding Author:** Prof. A.C. Pasqualotto. Molecular Biology Laboratory,
17
18 ISCMPA, Av Independencia 155, Hospital Dom Vicente Scherer, 8 andar, Porto
19
20 Alegre 90035-075, Brazil. Tel.: +55 51 99951614; fax: +55 51 32137491. E-
21
22 mail: pasqualotto@santacasa.tche.br
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

Background. BK virus (BKV) infection in immunosuppressive renal transplant patients might cause kidney allograft dysfunction leading to nephropathy and graft loss. Accurate determination of BKV viral load is critical to prevent BKV-associated nephropathy (BKVAN) but the cut-off that best predicts BKVAN remains controversial.

Methods. This was a prospective study involving kidney transplant recipients in two large academic hospitals in Brazil. Patients were screened for BKV infection every 3 months with a commercial and an in-house qPCR test, for the first year post-transplant. BKVAN was diagnosed on the basis of histopathology. ROC curve analysis was used to define the performance of BKV viremia and viruria in the prediction of BKVAN.

Results. Among 200 enrolled patients, most patients were male (58%), had a deceased donor (82%) and had diabetes mellitus as the main underlying disease (19.5%). BKV viremia and viruria were detected in 32.5% and 96.1%, respectively. BKVAN was diagnosed in 8 patients (4%). BKVAN was associated with viruria and viremia of 6.7 log and 4.1 log copies/ml, respectively using commercial kit. The cut-off for the in-house assay was 10.2 log copies/ml (urine) and 6.1 log copies/ml (plasma). The linearity between the commercial kit and the in-house assay was $R^2=0.83893$.

Conclusions. Our study shows that marked variability occur in BKV viral load when different qPCR methodologies are used. The in-house qPCR assay proved to be clinically useful, a cheaper option to commercial qPCR kits. There

1
2
3 is an urgent need to make BKV standards available to the international
4
5 community.
6
7

8 **Key words:** Kidney transplantation, PCR, polyomavirus, viremia, viruria.
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Review

INTRODUCTION

BK virus (BKV) is an important agent of infection in renal transplant recipients, with the potential to cause severe graft dysfunction and eventually graft loss (1). The prevalence of BKV-associated nephropathy (BKVAN) in renal transplant patients ranges between 1-10% in the first year after transplantation, which may cause graft loss in up to 80% of the patients within 5 years after transplantation (2-4). BKV is usually acquired early in life via aerosols (the virus is present in tonsils), mostly resulting in asymptomatic infection. Alternative routes of BKV transmission include uro-oral, faecal-oral, blood transfusion, organ transplantation, sexual, and soil water, which seems to be an important reservoir (5, 6). It is estimated that 80-90% of the population presents antibodies against BKV (3, 7, 8).

Since no effective antiviral is available to treat BKV infection, the best strategy relies upon BKVAN prevention. This may be achieved by frequent monitoring of BKV DNA load in urine and/or plasma samples, followed by a reduction of immunosuppressive therapy whenever significant viral replication is detected (9). International societies have recommended 4 log of BKV DNA in the plasma as the cut-off value that best predicts BKVAN. Also, commercial tests based on quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) may be expensive for routine use in clinical practice and limited data is available on the performance of in-house qPCR BKV tests. Considering these limitations, it is critical for institutions to conduct clinical validation studies to certify that their methods are useful to accurately guide clinical decisions (10-17).

The purpose of this study was to establish a clinically significant cut-off for BKV viruria and viremia to predict BKVAN, in a cohort of renal transplant

1
2
3 recipients. We also report the performance of an in-house qPCR for
4
5 quantification of BKV viral load and the performance of this test against a
6
7 commercially available qPCR kit.
8
9

10 11 12 **MATERIAL AND METHODS**

13 14 **Samples**

15
16
17 Between April 2012 and May 2013, 200 patients that received a kidney
18
19 transplant in two large teaching Brazilian hospitals (Santa Casa de Misericórdia
20
21 de Porto Alegre and Hospital de Clínicas de Porto Alegre) were enrolled in a
22
23 prospective study. Plasma (n=200 patients) and urine (n=102 patients) samples
24
25 were obtained at months 3, 6, and 9 following kidney transplantation, for the
26
27 determination of BKV viral load. DNA was extracted from 140 µl of plasma and
28
29 urine using the QIAamp RNA Mini Kit (QIAGEN, USA). Urine samples were
30
31 centrifuged before DNA extraction, as previously reported (18). In all reactions
32
33 β-globin was added as an internal positive control.
34
35
36
37

38 39 **DNA amplification with a commercial qPCR kit**

40
41 BKV DNA amplification was performed by qPCR using a commercial kit
42
43 (BKV Q-PCR Alert Ampliprobe, ELITechGroup Nanogen, Buttigliera Alta, Italy)
44
45 in a 7500 thermal cycler qPCR System (Applied Biosystems), as previously
46
47 described (18).
48
49

50 51 **DNA amplification with an in-house BKV qPCR test**

52
53 We designed a qPCR assay based on TaqMan chemistry in a highly
54
55 conserved region of the BKV genome targeting the VP1 gene (Gene ID:
56
57 1489515, Genomic Sequence NC_001538.1) with Primers 5'-
58
59
60

1
2
3 AGTGTTGAGAATCTGCTGTTGCTT-3' and 5'-
4
5 GGGATGAAGATTTATTTTGCCATGAAGAT-3'; probe FAM-
6
7 CATCACTGGCAAACAT-NFQ). Primers and probes for the human acidic
8
9 ribosomal protein (HuPO) were purchased from Applied Biosystems (ABI)
10
11 (primers 5'-GACAATGGCAGCATCTACAAC-3' and 5'-
12
13 GTTGCCAGTGTCTGTCTGC-3'; probe FAM-ATTGCGGACACCCTCC-NFQ)
14
15 and were used as an internal control. Briefly, the in-house qPCR assay
16
17 consisted of 1 µl 20X TaqMan assay, 10 µl of 2X TaqMan® Gene Expression
18
19 Master Mix, 4 µl of DNA and 5 µl of RNase-free water. PCR amplification was
20
21 performed on an ABI 7500 Thermocycler as follows: 95°C for 10 min, and 40
22
23 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min.
24
25
26
27

28 In order to accurately build a calibration curve, we designed a synthetic
29
30 DNA sequence of 351 bp based on the BK polyomavirus GenBank strain
31
32 JQ713822.1 sequence. The synthetic DNA was eluted, quantified and serially
33
34 diluted for the calibration curves that were built as a panel of nine vials with
35
36 concentrations ranging from 12.9 to 12.9 x 10⁹ copies/ml. This was also used to
37
38 define the limit of detection of the assay (12.9 genomic copies/ml).
39
40

41 **Clinical Data**

42
43
44 Patients' records were reviewed in order to obtain clinical data and
45
46 demographic information. Variables of interest included underlying kidney
47
48 diseases, evolution of renal function, HLA mismatches, renal biopsy results, and
49
50 changes in immunosuppressive regimens. Renal biopsies were performed by
51
52 clinical indication. The glomerular filtration rate (GFR) was estimated by using
53
54 the CKP-EPI equation (19). The study was approved by the Institutional Review
55
56 Board (protocol numbers 3531/11, 12-154 and 915/12), and followed the
57
58
59
60

1
2
3 guidelines and regulatory standards for research involving human subjects of
4
5 the Brazilian National Health Council (Resolution CNS/196).
6

7 **Statistical Analysis**

8
9
10 Descriptive statistics were used to summarize the data. The chi-square
11
12 and Fisher exact tests were used for the evaluation of categorical variables.
13
14 Data normality was checked by Kolmogorov-Smirnov test. Normally distributed
15
16 scalar variables were analyzed using ANOVA or Student *t*-Test when
17
18 appropriate. Non-normally distributed scalar variables were analyzed as non-
19
20 parametric using the Mann-Whitney test. The performance of qPCR tests was
21
22 evaluated by receiver operating characteristic (ROC) curves, using kidney
23
24 biopsy as the gold-standard to diagnose BKVAN. Linear plots were built to test
25
26 the linearity between the commercial and the in-house BKV qPCR tests. For all
27
28 comparisons, statistical significance was determined at a P value of < 0.05.
29
30 Predictors of BKVAN development were determined in a Cox regression model.
31
32 All variables with clinic relevance and p values of ≤ 0.05 at univariate analysis
33
34 were included in the Cox regression model. All statistical analyses were
35
36 performed using SPSS 20.0.
37
38
39
40
41
42
43

44 **RESULTS**

45
46
47 Table 1 summarizes the main characteristics of the patients enrolled.
48
49 Patients who developed BKV infection throughout the study period were similar
50
51 in several aspects to those who did not. Panel reactive antibodies (PRA)
52
53 differed between groups. BKV-positive group presented lower percentages of
54
55 patients with a less than 10% and between 10% and 49% PRAs. Distribution of
56
57
58
59
60

1
2
3 HLA mismatches did not differ between groups. Ninety-nine patients underwent
4 a renal biopsy and eight (4.0%) were found to have BKVAN. Graft loss occurred
5 in seven patients (3.5%) but only one patient (14.3%) the study period (overall
6 incidence 0.5%) the cause was BKVAN. Other seven patients (3.5%) died
7 during the study.
8
9
10
11
12
13

14 **BKV viruria and viremia using the commercial qPCR kit**

15
16
17 BKV viruria and viremia were detected in 96.1% (98/102) and 32.5%
18 (66/200) of patients respectively. BKV viruria was detected in months 3, 6 and 9
19 following transplantation in 74.5% (n=76), 60.6% (n=72), and 60.8% (n=62) of
20 patients, respectively, while BKV viremia occurred in 16.5% (n=33), 19.4%
21 (n=34), and 12.3% (n=18) of patients, in the same months of evaluation. Urine
22 and plasma BKV viral loads were higher in BKVAN when compared to non-
23 BKVAN patients ($p < 0.05$).
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 **Performance of the commercial and the in-house qPCR test**

34
35
36 Table 2 shows the cut-off values of qPCR for the prediction of BKVAN,
37 for BKV viremia and viruria with the commercial and in-house PCR tests. There
38 was a good linearity between qPCR tests ($R^2 = 0.8389$) (Figure 1).
39
40
41
42

43 **Predictors of BKVAN**

44
45
46 Table 3 shows the results of the multivariate analysis for risk factors for
47 BKVAN using the commercial qPCR kit. BKV viremia was independently
48 associated with BKVAN ($p = 0.018$), with the best cut-off determined at 3.85 log
49 (7,169 copies/ml).
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

DISCUSSION

This study defined clinically significant cut-off values for qPCR for the prediction of BKVAN. This was demonstrated by using two molecular tests: a commercially-available qPCR kit and an in-house qPCR test. At nine months post-transplantation follow up it was found that 32.5% had BKV viremia, 96.1% viruria but only 8 patients (4%) developed BKVAN. Previous studies performed in Brazil showed higher frequencies of BKVAN in kidney transplant recipients (20, 21), which may be related to differences in screening strategy (e.g., urinary decoy cells to trigger additional sampling for qPCR), regular biopsies, and ischemia times. The most relevant clinical implication of BKV infection in renal transplant recipients is based on its ability to lead to graft fibrosis followed by cause renal dysfunction and eventually to graft loss (13). Therefore in order to correctly interpret BKV viral loads, institutions should validate their own methodologies to determine the optimum cut-off values to be employed instead of using the recommended 'universal' cut-off of 4 log copies/ml as being clinically significant (3). Certainly, for accurate BKV viral load interpretation, clinicians must know which PCR test is being used and the performance of that particular assay. A variety of studies have analyzed the clinical impact of BKV viremia and viruria using different methodologies. Therefore these cut-off results cannot be compared against each other, due to the fact that those values were generated from distinct methods (10-17). There is a variety of factors that contribute to this diversity, including different protocols for DNA extraction, variations in primers and probes design, viral targets, PCR conditions, sample type and the use of different calibration curves (17, 22, 23).

1
2
3 Based on the present study we propose the cut-offs of ≥ 5.7 log and
4 ≥ 10.6 log copies/ml to predict BKVAN using urine samples with the
5 commercially-available and the in-house assays, respectively. As previously
6 reported we found that urine tests have a high negative predictive value,
7 therefore useful in excluding the diagnosis, but a very limited positive predictive
8 value. Urine qPCR may therefore be better used as screening tests (24-26).
9
10 Our results with the viremia tests were much more accurate and the cut-offs
11 were ≥ 3.8 log and ≥ 6.1 log copies/ml, respectively for the commercial and in-
12 house kits.
13
14

15
16
17
18
19
20
21
22
23 Our study demonstrated the relationship between PRA and BKV infection
24 considering patients with PRA $< 50\%$ of class I and II, although PRA ≥ 50
25 presented no relevance with BKV (Table 1). These data contrast with previous
26 studies, which considered PRA $\geq 10\%$ was not associated with BKV infection
27 (27). In our cohort 11.6% of patients had DSA, however 69% of these patients
28 did not evolved with BKV infection ($P \leq 0.001$).
29
30
31
32
33
34
35

36
37 Our in-house qPCR test has several strengths: (i) it is based on a highly
38 conserved region of the BKV genome targeting the viral structural protein VP1
39 gene that is highly conserved midst BKV strains (28); and (ii) the quantitative
40 process is based on the use of a synthetic DNA sequence as a calibration
41 curve, therefore not requiring the use of commercially available quantified BKV
42 DNA controls. Results obtained with the in-house qPCR test showed linearity
43 with the commercial kit (ELITechGroup Nanogen, Italy), although cut-off values
44 differed by ~ 2 log copies/ml. Probably the main advantage of the in-house
45 qPCR is its reduced cost, in comparison to the commercial test. For instance,
46 the cost per sample for running a single clinical sample, including the costs
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 related to laboratory personnel, is USD 35 and 121, respectively for the in-
4
5 house qPCR test and the commercial kit. If three samples are included in a run,
6
7 reducing the costs with positive controls, costs per sample would be USD 20
8
9 (in-house qPCR) and USD 55 (commercial test).
10

11
12 Some limitations of this study must be recognized. First, the number of
13
14 patients with BKVAN was limited even though the percentage of recipients that
15
16 developed this condition is consistent with the literature (2, 3). Second, only for
17
18 cause kidney biopsies were performed leaving the possibility that some patients
19
20 could present BKVAN that could be uncovered by protocol biopsies. However,
21
22 the evaluation of the two groups (having or not a biopsy performed) was similar
23
24 regarding variables of interest (data not shown). Also, we only measured BKV
25
26 viral loads at months 3, 6 and 9 after transplantation and perhaps a longer
27
28 follow-up could reveal a higher incidence of BKVAN, however it has being
29
30 demonstrated that the peak incidence of this condition occurs within the time
31
32 frame of our observation (29, 30). Lastly urine samples were included from one
33
34 center only resulting in a smaller number of urine samples in comparison to
35
36 plasma samples.
37
38
39

40
41 In conclusion, in this prospective multicenter study we validated clinically
42
43 two qPCR assays for BKV quantification, a commercially-available kit and an in-
44
45 house test. By utilizing the results of such strategies in clinical practice clinicians
46
47 may better manage patients infected with BKV, modifying immunosuppressive
48
49 therapies in a timely manner. The low frequency of BKVAN observed in our
50
51 study (4%) is probably related to proper disease awareness, as well as BKV
52
53 DNA monitoring.
54
55
56
57
58
59
60

ACKNOWLEDGMENTS

GGP is supported by grants from CAPES. DDP is supported by grants from FAPERGS (04/2013) and CNPq (445314/2014-1). ACP is a 1-D PQ scientist for CNPq. We are in debt with Dr Leonardo L. da Motta for calculating the costs related to the PCR reactions.

FUNDING

This study was supported by a grant from FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul).

COMPETING INTERESTS

None declared.

REFERENCES

1. van Aalderen MC, Heutinck KM, Huisman C, and ten Berge IJ. BK virus infection in transplant recipients: clinical manifestations, treatment options and the immune response. *Neth J Med* 2012; 70(4): 172-183.
2. Cannon RM, Ouseph R, Jones CM, Hughes MG, Eng M, and Marvin MR. BK viral disease in renal transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2011; 16(6): 576-579.
3. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: Interdisciplinary

- 1
2
3 analyses and recommendations. *Transplantation* 2005; 79(10): 1277-
4 1286.
5
6
7 4. Egli A, Binggeli S, Bodaghi S et al. Cytomegalovirus and polyomavirus
8 BK posttransplant. *Nephrology, dialysis, transplantation : official*
9 *publication of the European Dialysis and Transplant Association -*
10 *European Renal Association* 2007; 22 Suppl 8: viii72-viii82.
11
12
13
14
15 5. Siguier M, Sellier P, and Bergmann JF. BK-virus infections: a literature
16 review. *Medecine et maladies infectieuses* 2012; 42(5): 181-187.
17
18
19
20 6. Shah KV. Human polyomavirus BKV and renal disease. *Nephrology,*
21 *dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and*
22 *Transplant Association - European Renal Association* 2000; 15(6): 754-
23 755.
24
25
26
27
28
29 7. Brennan DC, Agha I, Bohl DL et al. Incidence of BK with tacrolimus
30 versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression
31 reduction. *Am J Transplant* 2005; 5(3): 582-594.
32
33
34
35 8. Knowles WA, Pipkin P, Andrews N et al. Population-based study of
36 antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian
37 polyomavirus SV40. *J Med Virol* 2003; 71(1): 115-123.
38
39
40
41
42 9. Kuypers DR. Management of polyomavirus-associated nephropathy in
43 renal transplant recipients. *Nature reviews Nephrology* 2012; 8(7): 390-
44 402.
45
46
47
48
49 10. Bechert CJ, Schnadig VJ, Payne DA, and Dong J. Monitoring of BK viral
50 load in renal allograft recipients by real-time PCR assays. *Am J Clin*
51 *Pathol* 2010; 133(2): 242-250.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 11. Hassan S, Mittal C, Amer S et al. Currently recommended BK virus
4 (BKV) plasma viral load cutoff of ≥ 4 log₁₀/mL underestimates the
5 diagnosis of BKV-associated nephropathy: a single transplant center
6 experience. *Transplant infectious disease : an official journal of the*
7
8
9
10
11
12
13 *Transplantation Society* 2014; 16(1): 55-60.
- 14 12. Hirsch HH, Drachenberg CB, Steiger J, and Ramos E. Polyomavirus-
15 associated nephropathy in renal transplantation: critical issues of
16 screening and management. *Advances in experimental medicine and*
17
18
19
20
21 *biology* 2006; 577: 160-173.
- 22 13. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M et al. Prospective study of
23 polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant
24 recipients. *The New England journal of medicine* 2002; 347(7): 488-496.
- 25 14. Kudose S and Dong J. Clinical validation study of quantitative real-time
26 PCR assay for detection and monitoring of BK virus nephropathy. *Ann*
27
28
29
30
31
32
33
34
35 *Clin Lab Sci* 2014; 44(4): 455-460.
- 36 15. Mitui M, Leos NK, Lacey D, Doern C, Rogers BB, and Park JY.
37 Development and validation of a quantitative real time PCR assay for BK
38 virus. *Mol Cell Probes* 2013; 27(5-6): 230-236.
- 39 16. Pollara CP, Corbellini S, Chiappini S et al. Quantitative viral load
40 measurement for BKV infection in renal transplant recipients as a
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
56
57
58
59
60
predictive tool for BKVAN. *The new microbiologica* 2011; 34(2): 165-171.
17. Randhawa P, Kant J, Shapiro R, Tan H, Basu A, and Luo C. Impact of
genomic sequence variability on quantitative PCR assays for diagnosis
of polyomavirus BK infection. *Journal of clinical microbiology* 2011;
49(12): 4072-4076.

- 1
2
3 18. Pinto GG, Poloni JA, Carneiro LC, Baethgen LF, Barth AL, and
4
5 Pasqualotto AC. Evaluation of different urine protocols and DNA
6
7 extraction methods for quantitative detection of BK viruria in kidney
8
9 transplant patients. *Journal of virological methods* 2013; 188(1-2): 94-96.
10
11
- 12 19. Arlet JB, Ribeil JA, Chatellier G et al. Determination of the best method
13
14 to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine in adult
15
16 patients with sickle cell disease: a prospective observational cohort
17
18 study. *BMC Nephrol* 2012; 13: 83.
19
- 20 20. Zalona AC, Varella RB, Takiya CM, Goncalves RT, Zalis MG, and
21
22 Santoro-Lopes G. A qualitative seminested PCR assay as an alternative
23
24 to urine cytology for BK polyomavirus screening after renal
25
26 transplantation. *Intervirology* 2013; 56(4): 249-252.
27
28
- 29 21. Maia TM, Silva SF, Silva SL, Holanda MC, Nascimento JM, and Ferreira
30
31 MV. Polyomavirus-infected decoy cells in cytocentrifuged urine cytology
32
33 specimens from renal transplant recipients. *Acta Cytol* 2011; 55(5): 445-
34
35 448.
36
37
- 38 22. Hayden RT, Yan X, Wick MT et al. Factors contributing to variability of
39
40 quantitative viral PCR results in proficiency testing samples: a
41
42 multivariate analysis. *J Clin Microbiol* 2012; 50(2): 337-345.
43
44
- 45 23. Hoffman NG, Cook L, Atienza EE, Limaye AP, and Jerome KR. Marked
46
47 variability of BK virus load measurement using quantitative real-time
48
49 PCR among commonly used assays. *J Clin Microbiol* 2008; 46(8): 2671-
50
51 2680.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 24. Babel N, Fendt J, Karaivanov S et al. Sustained BK viraemia as an early
4 marker for the development of BKV-associated nephropathy: analysis of
5 4128 urine and serum samples. *Transplantation* 2009; 88(1): 89-95.
6
7
8
- 9 25. Costa C, Bergallo M, Astegiano S et al. Monitoring of BK virus replication
10 in the first year following renal transplantation. *Nephrology, dialysis,*
11 *transplantation : official publication of the European Dialysis and*
12 *Transplant Association - European Renal Association* 2008; 23(10):
13 3333-3336.
14
15
16
17
18
- 19 26. Viscount HB, Eid AJ, Espy MJ et al. Polyomavirus polymerase chain
20 reaction as a surrogate marker of polyomavirus-associated nephropathy.
21 *Transplantation* 2007; 84(3): 340-345.
22
23
24
25
26
- 27 27. Awadalla Y, Randhawa P, Ruppert K, Zeevi A, and Duquesnoy RJ. HLA
28 mismatching increases the risk of BK virus nephropathy in renal
29 transplant recipients. *American journal of transplantation : official journal*
30 *of the American Society of Transplantation and the American Society of*
31 *Transplant Surgeons* 2004; 4(10): 1691-1696.
32
33
34
35
36
37
- 38 28. Krumbholz A, Bininda-Emonds OR, Wutzler P, and Zell R. Evolution of
39 four BK virus subtypes. *Infect Genet Evol* 2008; 8(5): 632-643.
40
41
42
- 43 29. Girmanova E, Brabcova I, Bandur S, Hribova P, Skibova J, and Viklicky
44 O. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 120 Czech
45 renal transplant recipients. *J Med Virol* 2011; 83(8): 1395-1400.
46
47
48
- 49 30. Huang G, Chen LZ, Qiu J et al. Prospective study of polyomavirus BK
50 replication and nephropathy in renal transplant recipients in China: a
51 single-center analysis of incidence, reduction in immunosuppression and
52 clinical course. *Clinical transplantation* 2010; 24(5): 599-609.
53
54
55
56
57
58
59
60

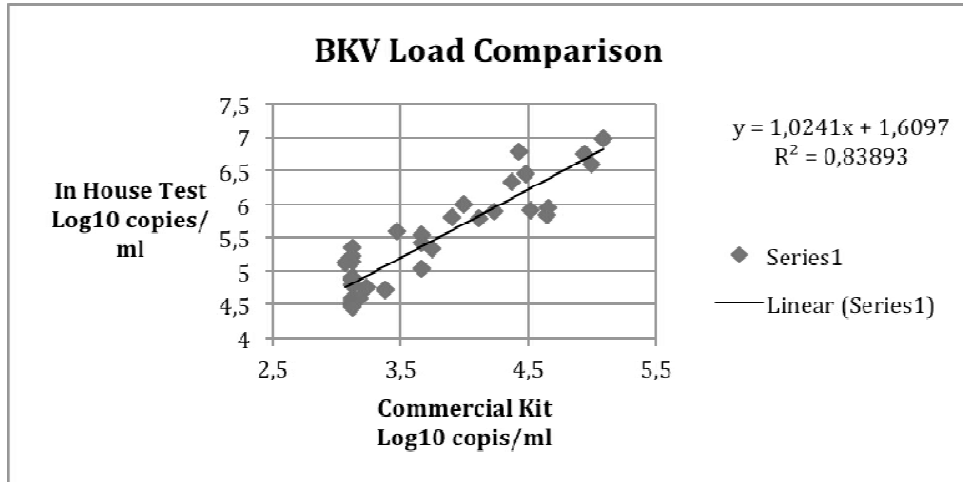


Figure 1. Performance (linearity) of the commercial and the in-house plasma BK virus qPCR test.

For Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the population studied. Patient's BKV status refers to the presence of any positive molecular test for BKV, either in urine or plasma.

Variable	All patients (n=200)	BKV-negative patients (n=75)	BKV-positive patients (n=125)	P value
Recipient age, mean (sd)	46.3 (13.2)	47.4 (12.9)	45.7 (13.4)	0.659
Donor age, mean (sd)	44.5 (16.3)	43.5 (17.3)	45.2 (15.8)	0.409
Male gender, recipient (%)	58.0	54.7	60	0.459
Male gender, donor (%)	52.0	51.4	52.8	0.843
Deceased donor (%)	82.0	82.4	81.6	0.883
Underlying disease (%)				
Diabetes mellitus	19.5	26.7	15.2	0.048
ADPKD	13.5	9.3	16	0.182
SAH	12.0	13.3	11.2	0.653
Glomerulonephritis	10.0	12	8.8	0.465
Reflux nephropathy	6.0	6.7	5.6	0.758
Obstructive uropathy	2.5	2.7	2.4	0.907
FSG	2.5	1.3	3.2	0.413
SLE	1.5	0	2.4	0.176
Unknown	32.5	28	35.2	0.293
Induction (%)				
ATG	32.5	41.3	27.2	0.039
Basiliximab	56.5	49.3	60.8	0.113
Others	0.5	0	0.8	0.437
None	10.5	9.3	11.2	0.677

PRA (%)**Class I**

<10%	64.0	55.4	69	0.033
≥10% to <50%	22.0	31.1	16.7	0.037
≥50%	14.0	13.5	14.3	0.641

Class II

<10%	62.0	53.3	67.2	0.050
≥10% - <50%	31.0	42.7	24	0.006
≥50%	7.0	4	8.8	0.198

CMV status (%)

D- / R-	1.6	0	2.5	0.185
D- / R+	17.2	17.4	17.5	0.995
D+ / R-	4.2	4.3	4.2	0.943
D+ / R+	76.7	78.3	75.8	0.634
+ve antigenemia	25.0	18.7	29.4	0.111

HLA Mismatch, mean (sd)

0 (%)	0.5	0	0.8	0.437
1 – 3 (%)	22	29.3	17.6	0.169
4 – 6 (%)	77.5	70.7	81.6	0.730

DSA (%)	11.6	22.7	4.8	<0.001
---------	------	------	-----	--------

Acute rejection (%)	12.5	19.5	29.3	0.269
---------------------	------	------	------	-------

Legend: ADPKD, Autosomal dominant polycystic kidney disease; ATG, Anti-Thymocyte globulin; BKV, BK virus; CMV, Cytomegalovirus; D, Donor; DSA, Donor-specific antibody; FSG, Focal segmental glomerulosclerosis; HLA, Human leukocyte antigen; PRA, Panel reactive antibody; R, Recipient; sd, standard deviation; SAH, Systemic Arterial Hypertension; SLE, Systemic lupus erythematosus.

Table 2. Performance of BKV viral load for the prediction of BKV-associated nephropathy, using a commercial and an in-house qPCR test.

	Sensitivity % (95% CI)	Specificity % (95% CI)	PPV % (95% CI)	NPV % (95% CI)
Urine viral load (copies/ml)				
≥5.7 log (commercial PCR kit)	100 (48–100)	79 (64–90)	36 (13–65)	100 (90–100)
≥6.7 log (commercial PCR kit)	100 (48–100)	81 (67–92)	38 (14–68)	100 (90–100)
≥10.6 log (in-house method)	75 (64–86)	64 (53–75)	73 (32–86)	100 (90–100)
Plasma viral load (copies/ml)				
≥3.8 log (commercial PCR kit)	88 (47–98)	96 (90–99)	64 (31–89)	99 (94–100)
≥4.1 log (commercial PCR kit)	88 (47–98)	98 (93–100)	77 (40–97)	99 (94–100)
≥6.1 log (in-house method)	87 (81–93)	100 (94–100)	73 (39–94)	100 (91–100)

Legend: CI, confidence interval; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; qPCR, quantitative real-time polymerase chain reaction.

Table 3. Results of Cox regression model for the prediction of BKVAN using a commercial qPCR test.

	P value	Exp(B)	95.0% CI for Exp(B)	
			lower	upper
Acute rejection	0.487	2.846	0.149	54.214
Diabetes mellitus	0.324	2.658	0.38	18.578
Viremia at 3.85 log	0.018	35.903	1.85	696.868
GFR at month 6	0.512	1.521	0.434	5.328

Legend: CI, Confidence interval; GRF, Glomerular rate filtration; qPCR, quantitative real time polymerase chain reaction.

For Review

. Considerações Finais

Ao longo da pesquisa, evidenciou-se que não há consenso na literatura entre os pontos de corte de virúria e viremia para BKVN. Somado a isso, já são descritos fatores que predispõem à infecção por BKPyV; entretanto, o desenvolvimento da mesma é multifatorial e relacionado a variáveis independentes, seja do doador ou do receptor.

Uma das recomendações da AST é que seja realizado o rastreio dos pacientes com infecção por BKPyV através da virúria. A fim de diminuir as variáveis que alteram a carga viral, padronizamos a extração de urina para melhor detectar a virúria. Optou-se por utilizar o *pellet* urinário já que sua carga viral mostrou-se superior a uma alíquota da urina total homogeneizada. A extração de DNA foi realizada através do *kit* de extração para RNA; esse foi escolhido em detrimento ao *kit* de extração de DNA por recomendação do fabricante, uma vez que poderia eliminar interferentes presentes na urina possivelmente não detectados na padronização desse protocolo, uma vez o número de amostras foi reduzido.

A prevalência de BKVN em nosso estudo foi de 4% (8/200). O ponto de corte da viremia para predição de BKVN de $\geq 3,8 \log$ cópia/mL, mostrou-se próximo ao que descrito na literatura (4 \log cópias/mL); entretanto, o valor para virúria de $\geq 5,7 \log$ cópias/mL foi inferior ao valor recomendado em outros estudos (7 \log cópias/mL). Esses resultados evidenciam a importância de se estabelecer os pontos de corte de virúria e viremia para cada centro de investigação, para que casos presuntivos de BKVN não sejam subjugados e evitando um quadro mais grave da infecção. Paralelamente, construímos um

teste de detecção quantitativo *in-house* para BKPyV na urina e no plasma e seus resultados mostraram-se lineares com os resultados do *kit* de detecção comercial.

Por fim, é de suma importância ressaltar que sem o financiamento da FAPERGS/CAPES através do edital PRONEM não seria possível a realização desse trabalho para os pacientes atendidos na Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Através desse estudo foi possível estreitar laços de colaboração no exterior, a exemplo do Dr. Raymund R. Razonable médico pesquisador na *Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, and the William J von Leibig Transplant Center, College of Medicine, Mayo Clinic, Rochester, Estados Unidos.*

5. Anexos

5.1. Metodologia

5.1.1 Desenho do estudo

Estudo de coorte prospectivo multicêntrico.

5.1.2. Critérios de inclusão dos pacientes

Foram incluídos no estudo todos os novos pacientes adultos (≥ 18 anos) submetidos a transplante de rim no Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre que consentiram em participar do estudo. Incluiu-se ambos os sexos, tanto receptores de doador vivo como de doador falecido.

5.1.3. Amostras

Amostras de plasma e urina foram coletadas de 200 pacientes após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos mesmos no período de abril de 2012 a maio de 2013, no Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Para análise da virúria e viremia foi utilizado um total de 140 μ l das amostras de plasma e urina. O material genético das amostras foi extraído por *kit* comercial QIAamp RNA Mini Kit (QIAGEN, USA). Conforme descrito no Artigo 3.1 (Pinto e cols., 2013) as amostras de urina foram previamente centrifugadas. Para o controle interno das extrações de DNA foi adicionado beta globina a cada extração e essas foram conduzidas de acordo com as instruções dos fabricantes. Os pacientes incluídos no estudo foram acompanhados por 9 meses. As

amostras foram colhidas durante a rotina de visitas aos hospitais para coleta de material para exames laboratoriais (3, 6, 9 meses após o transplante).

5.1.4. Critério de exclusão dos pacientes

Foram desconsiderados para inclusão todos os pacientes <18 anos e que tenha realizado transplante de rim concomitantemente com qualquer outro transplante de órgão sólido. Paciente com histórico de outros transplantes não renal também foram excluídos da amostragem.

5.2. Aprovação pelos Comitês de Ética em pesquisa



COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
UFCSPA

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA, registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o nº 075/05 em 23/07/04, analisou o Projeto:

Projeto: 11-915

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

Pesquisadores:

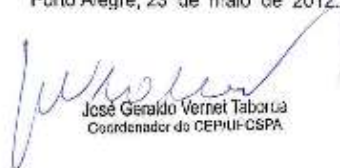
ALESSANDRO COMARÚ PASQUALOTTO

GABRIEL GODINHO PINTO

Título: AVALIAÇÃO DA VIREMIA PELO BKV-TRANSPLANTE RENAL E DETERMINAÇÃO DO PONTO DE CORTE PARA PREDIÇÃO DE NEFROPATIA ASSOCIADA AO VIRUS.

Esse projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos conforme as Resoluções 196/09 e demais Resoluções complementares. Toda e qualquer alteração do projeto, assim como eventos adversos graves, deverão ser comunicados a este CEP. Os TCLE, quando necessários, somente poderão ser utilizados após prévia e explícita aprovação (carimbo) de sua redação por este CEP.

Porto Alegre, 23 de maio de 2012.



José Geraldo Vernet Taborca
Coordenador do CEP/UF-CSPA

PROJETO DE PESQUISA

Título: Avaliação da viremia pelo BKV pós-transplante renal e determinação do ponto de corte para predição de nefropatia associada ao vírus

Área Temática:

Pesquisador: Afonso Luis Barth

Versão: 2

Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA / UFRGS

CAAE: 01188612.9.0000.5327

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 75438

Data da Relatoria: 15/08/2012

Apresentação do Projeto:

Estudo de coorte de pacientes transplantados oriundos do HCPA e ISCMPA em que pretende avaliar através de PCR em tempo real os pontos de corte de virúria e viremia por BKV que se associem com nefropatia por esse vírus, evento esse relativamente comum entre transplantados renais. (Associa-se a perda do enxerto em até 80% dos casos de nefropatia por BKV, essa ocorrendo em 2 a 8 % dos transplantados.)

Objetivo da Pesquisa:

Determinar os pontos de corte de virúria e viremia por BKV que possam melhor predizer o desenvolvimento de nefropatia por BKV, em duas coortes de pacientes submetidos a transplante renal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos mínimos da coleta de sangue para avaliação da viremia.
Benefício do conhecimento, podendo identificar pacientes candidatos a tratamento da infecção pelo vírus, objetivando diminuir a incidência de nefropatia pelo BKW. Embora já haja alguns estudos de outros centros, os resultados ainda são inconclusivos e ressaltam a importância de se testar a população local em virtude de fatores genéticos do vírus em diferentes sítios.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Avaliação de duas coortes, que serão acompanhadas por 12 meses após o transplante. Estimam avaliar 200 pacientes, o que determinaria encontrar entre 4 e 16 (2 a 8%) pacientes com nefropatia pelo BKV, o que talvez dificulte alcançar os objetivos propostos.

Os pacientes serão avaliados através da pesquisa de células decoy na urina, quando positivas, indicarão a realização de PCR para virúria e viremia. O desfecho nefropatia do BKW implica na realização de biópsia renal, complementada por imunoistoquímica. Não fica claro se todos os pacientes fazem biópsia renal na rotina, embora pareça ser esse o caso, e também não é mencionado o momento em que é feita a biópsia. O pesquisador esclarece que as biopsias renais serão realizadas durante a rotina de acompanhamento dos pacientes. Pendência atendida.

Na avaliação estatística, apenas menciona dados de descrição da população, devendo ser mencionado como pretende estabelecer os pontos de corte de viremia/virúria (Curva ROC?)
O pesquisador afirma que os pontos de corte de virúria e viremia por BKV que possam predizer nefropatia por BKV serão determinados através de análise de curva ROC (receiver operator characteristic), para avaliar a sensibilidade e especificidade do método (descrito no projeto, página 14). Pendência atendida.

O cronograma está defasado, deve ser refeito.
O pesquisador apresenta o cronograma reformulado, encontra-se na página 17 do projeto. Pendência atendida.

O orçamento é bastante vultoso e se percebe que o projeto concorreu a um edital FAPERGS/CNPQ de 2011, não ficando explícito se foram contemplados com o edital.

O pesquisador afirma que o presente projeto foi contemplado no edital PRONEM/FAPERGS/CNPq n. 003/2011, possuindo verba suficiente para sua realização. Pendência atendida.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi reformulado e encontra-se em condições de aprovação.

Recomendações:

Retirar os grifos do TCLE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram adequadamente respondidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

A versão do projeto e do TCLE aprovados correspondem aos documentos submetidos em 06/08/2012. Qualquer alteração nestes documentos devem ser encaminhados para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada.

Projeto cadastrado no Sistema WebGPPG: 12-0154.

Na data de emissão desse parecer estava pendente (1) parecer de instituições coparticipantes.

PORTO ALEGRE, 15 de Agosto de 2012

Assinado por:
José Roberto Goldim



Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Rua Prof. Annes Dias, 295 – Telefone: (51) 3214.8080 – Fax: (51) 3214.8585
CEP 90030-090 – Porto Alegre – Rio Grande do Sul – CNPJ: 97815000/0001-68
Site: www.santacasa.org.br – E-mail: marketing@santacasa.teche.br



PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer nº 160/11

Protocolo nº 3531/11

Título: “Avaliação da viremia pelo BKV pós-transplante renal e determinação do ponto de corte para predição de nefropatia associada ao vírus”.

Pesquisador Responsável: Alessandro Comarú Pasqualotto

Instituição onde se realizará – Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

Data de Entrada: 14/04/2011

II – Objetivos – Objetivo Geral: Determinar os pontos de corte de virúria e viremia por BKV que possam melhor prever o desenvolvimento de nefropatia por BKV, em duas coortes de pacientes submetidos a transplante renal.

Objetivos específicos: • Determinar a incidência de virúria por BKV em transplantados de rim, bem como o momento da ocorrência da mesma;

- Determinar a incidência de virúria por BKV em transplantados de rim, bem como o momento da ocorrência da mesma;
- Determinar a incidência de viremia por BKV, bem como o momento da ocorrência da mesma;
- Determinar a incidência de nefropatia associada ao BKV;
- Correlacionar os testes de citopatologia urinária (células decoy) com a detecção quantitativa de DNA de BKV na urina, através da técnica de PCR em tempo real;
- Caracterizar os fatores de risco para virúria, viremia e nefropatia por BKV.

III - Sumário do Projeto

Descrição e caracterização da amostra: Estudo de corte prospectivo observacional multicêntrico. Para todos os pacientes incluídos no estudo, serão obtidos dados demográficos, bem como informações referentes ao procedimento cirúrgico, às doenças de base e à presença ou ausência de rejeição. Dados referentes ao protocolo empregado para imunossupressão serão observados, bem como a função do órgão transplantado.

Crêterios de inclusão e exclusão: Serão considerados para inclusão no estudo todos os novos pacientes adultos (≥ 18 anos) submetidos a transplante de rim na Santa Casa Complexo Hospitalar e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, durante período de um ano, a contar de julho de 2011. Serão incluídos todos os receptores de transplante renal, isolado ou combinado a transplante de pâncreas, que consistam em participar do estudo. Incluir-se-ão ambos os sexos, tanto receptores de doador vivo como de doador falecido.

Adequação das condições - Hospital escola com infra-estrutura adequada para a realização do estudo descrito

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/ISCMPA Fone/Fax (51) 3214-8571 e-mail: cep@santacasa.teche.br
Reconhecido Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP / Ministério da Saúde
IRB – Institutional Review Board pelo U.S. Department of Health and Human Services (DHHS)
Office for Human Research Protections (OHRP) 800 número - IRD0002509
PWA – Federalwide Assurance 800 número - PWA00002849



Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Rua Prof. Annes Dias, 295 – Telefone: (51) 3214.8080 – Fax: (51) 3214.8585
CEP 90020-090 – Porto Alegre – Rio Grande do Sul – CNPJ: 92815000/0001-68
Site: www.santacasa.org.br – E-mail: marketing@santacasa.tche.br



IV - Comentários:

- **Justificativa do uso de placebo** – Não se aplica.
- **Análise de riscos e benefícios** – Adequado.
- **Adequação do termo de consentimento e forma de obtê-lo** – Adequado.
- **Informação adequada quanto ao financiamento** – Será financiado pela FAPERGS, conforme informado no projeto.
- **Outros centros no caso de estudos multicêntricos** – Não se aplica.

V - Parecer do Relator – “Após avaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer”.

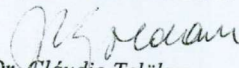
VI - Data da Reunião: 03/05/2011.

“Projeto e Termo de Consentimento, Aprovados”.

Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA. Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).

2 – Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefia do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética.

Porto Alegre, 05 de Maio de 2011.


p/ Prof. Dr. Cláudio Telöken
Coordenador do CEP/ISCMPA

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/ISCMPA
Reconhecido:

Fone/Fax (51) 3214-8571 – e-mail: cep@santacasa.tche.br Parecer 160/11

Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP / Ministério da Saúde
IRB – Institutional Review Board pelo U.S. Department of Health and Human Services (DHHS)
Office for Human Research Protections (ORPH) sob número - IRB00002509.
FWA – Federalwide Assurance sob número - FWA00002949.

5.3. Termo de Consentimento livre e Esclarecido

O. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar de um projeto de pesquisa que tem o objetivo de realizar testes para diagnosticar, de forma mais precoce, a infecção por um vírus, chamado de BK. A maioria da população já teve contato com esse vírus que fica latente, ou seja, sem causar doença. Quando se faz uso de medicamentos que baixam a imunidade para evitar a rejeição do rim transplantado esse vírus pode começar a se multiplicar e causar dano no rim transplantado e até a perda do órgão. Como parte deste estudo, será coletado a sua urina e analisada a cada 3 meses para avaliar se há a presença deste vírus, durante um ano; se algum destes for positivo, analisaremos também seu sangue (4mL) que será coletado no mesmo dia da coleta da urina.

Este estudo está sendo conduzido em dois hospitais, a Santa Casa de Porto Alegre (ISCOMPA) e o Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Esperamos contar com a participação de 200 pacientes. Para que você participe do estudo, será preciso que assine este documento em duas vias, sendo que uma ficará com você.

Sua participação neste estudo é voluntária e, caso você não deseje participar, não haverá nenhum prejuízo ao seu tratamento. Você não será remunerado ao participar do estudo. O benefício que este estudo poderá trazer para você será o de ter a possibilidade de um diagnóstico de forma mais precoce de infecção por este vírus. Poderá também trazer um melhor conhecimento para os pacientes com problemas semelhantes ao seu no futuro em relação ao teste de quantificação da infecção no sangue e na urina que traz mais risco de causar dano no rim transplantado. O único risco conhecido do estudo se relaciona à coleta do sangue, que pode lhe causar algum desconforto no local da picada ou hematoma (roxão). A coleta de amostra de urina será feita em frasco estéril pelo próprio paciente. Deixamos claro que, se você, aceitar participar, mas por qualquer razão, desistir durante o andamento do estudo o seu cuidado pela equipe médica será mantido.

Em caso de alguma dúvida, você poderá entrar em contato com o Dr. Alessandro Pasqualotto, coordenador deste estudo na ISCOMPA, pelo telefone 51 99951614 ou o Dr. Afonso Luís Barth coordenado deste estudo no HCPA, pelo telefone 51 33598707. Se você tiver qualquer outra pergunta sobre o estudo, pode também procurar o **Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – CEP/HCPA**, pelo número **51 33597640**.

A ser preenchido pelo paciente ou representante:

Nome: _____ Assinatura: _____

Data: __/__/____

A ser preenchido pelo pesquisador que aplicou este termo:

Nome: _____ Assinatura: _____

Data: __/__/____

5.4. Planilha de coleta de dados dos pacientes

Estudo BKV - Protocolo de coleta de dados

Ficha número: ____

DADOS DO RECEPTOR
Nome: _____
Instituição; () ISCMPA; () HCPA. Prontuário número: _____
Data de nascimento: __/__/____ Sexo: () Masculino () Feminino
Data transplante: __/__/____
Doença básica: () GNC; () Urop Obstrutiva; () HAS; () DM; () DRPA; () PNC/RVU; () Outra (_____); () Desconhecida«doenca_basica»
Data do início da diálise: «tempo_dialise» __/__/____
Prova cruzada pré Tx: T CDC (); CF (); B CDC (); CF ();
PRA: Atual: CI: ___ % CII: ___% Pico: CI: ___ % CII: ___% (data: __/__/____)
Anticorpo doador-específico: () Sim; () Não. Se presentes anotar especificidade e intensidade da fluorescência: _____
HLA: A: __/__ B: __/__ DR: __/__
CMV pré-TR (+/-)«ultimo_pra_cii»: IgG: __; IgM: __
Protocolo imunossupressor inicial (anotar):«protoc_imun_inicial»
Indução: () ATG; () Basiliximabe; () Outro: _____«inducaao»
Tempo de isquemia fria: __:__ («tempo_de_isquimia_h»horas : :«tempo_de_isquimia_m»minutos)
DADOS DO DOADOR
Nome: _____;

Idade (anos): ____
Tipo: () Vivo; () Falecido.«tipo»
Sexo: () Masculino () Feminino
HLA: A: __/__ B: __/__ DR: __/__
CMV pré-TR (+/-)«ultimo_pra_cii»: IgG: __; IgM: __
Se Falecido. Causa do óbito: «doador_falecido_causa» _____
Creatinina do final do doador falecido: «creat_doad_in» __, _ mg/dL «creat_doad_fin»
Doador de critérios expandidos: () Não () Sim - quais () HAS () DM
Biópsia pré-implante: percentual de glomeruloesclerose _____, fibrose intersticial _____ atrofia tubular _____, arteriolesclerose _____ outras _____ alterações relevantes _____
DADOS PÓS-TRANSPLANTE
DGF (HD por qualquer motivo na 1.a semana)«dgif»: () SIM duração: ____ «dgif_duracao»dias; () Não
Rejeição aguda (RA) pós-TR: () Sim; () Não.
Banff 2007 episódio 1: ____
Banff 2007 episódio 2: ____ «rejeicao_aguda_pos_tr»
Banff 2007 episódio 3: ____ «rejeicao_aguda_pos_tr»«rejeicao_aguda_pos_tr»
Tratamentos RA: () Metilprednisolona: __ dias; () ATG: __ doses; () plasmaferese; () IvIg; () Rituximabe. () Outro 1 _____; () Outro 2 _____ «doad_crit_exp»
Infecção CMV: «infec_vir_pos_tx» () Não; () subclínica; () clínica«tipo_infec_vir_pos_tx»
Infecções bacterianas: () Sim; () Não

Creatinina: POD 7: __, __ mg/dL; POD 30: __, __ mg/dL; POD 90: __, __ mg/dL; POD 180: __, __ mg/dL; POD 360: __, __ mg/dL; PO 18 meses: __, __ mg/dL; PO 24 meses: __, __ mg/dL;
Perda do enxerto: () Sim; () Não «perda_enxerto» Data: «data_perda_enxerto» __/__/____
Causa da perda: _____
Óbito: () Sim; () Não «perda_enxerto» Data: «data_perda_enxerto» __/__/____
Causa do óbito: _____
PROTOCOLO DE COLETA DOS DADOS PRIMÁRIOS.
Virúria e viremia: indicar número de cópias (____); Células Decoy (presentes ou ausentes); Biópsia (sim/não)
Mês 1; (____) Virúria; (____) Viremia; () Decoy; Houve biópsia () Sim; () Não Imunossupressão: Medicação e dosagem ()
Mês 2; (____) Virúria; (____) Viremia; () Decoy; Houve biópsia () Sim; () Não Imunossupressão: Medicação e dosagem ()
Mês 3; (____) Virúria; (____) Viremia; () Decoy; Houve biópsia () Sim; () Não Imunossupressão: Medicação e dosagem ()
Mês 6; (____) Virúria; (____) Viremia; () Decoy; Houve biópsia () Sim; () Não Imunossupressão: Medicação e dosagem ()
Mês 9; (____) Virúria; (____) Viremia; () Decoy; Houve biópsia () Sim; () Não Imunossupressão: Medicação e dosagem ()
Mês 12; (____) Virúria; (____) Viremia; () Decoy; Houve biópsia () Sim; () Não Imunossupressão: Medicação e dosagem ()