

Sylwia Rynans^{*1}, Tomasz Dzieciatkowski¹, Grażyna Młynarczyk¹

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

Wpłynęło w marcu 2011 r.

1. Wstęp. 2. Ogólna budowa poliomawirusów. 3. Zakażenia układu oddechowego. 4. Śródmiąższowe zapalenie nerki przeszczepionej. 5. Krwotoczne zapalenie pęcherza. 6. Postępująca wieloogniskowa leukoencefalopatia. 7. Stwardnienie rozsiane – przypuszczalny udział poliomawirusów w patogenezie. 8. Choroby nowotworowe powodowane przez ludzkie poliomawirusy. 9. Diagnostyka. 10. Terapia zakażeń poliomawirusami. 11. Profilaktyka. 12. Podsumowanie

Polyomavirus diseases of immunosuppressed patients

Abstract: The human polyomaviruses are a group of nonenveloped, icosahedral viruses with a small, supercoiled double-stranded DNA genome. Nowadays, there are five known human polyomaviruses widespread within population: BK, JC, WU, KI and Merkel cell polyomavirus. After primary infection, they establish ubiquitous, persistent infections in healthy individuals. Reactivation can occur when the immune system is impaired, leading to disease progression. All of them are recognized as important pathogens causing severe morbidity and mortality in immunocompromised patients, especially in persons who have received a solid-organ transplant. They cause a variety of diseases in this group of patients, such as: BKV nephropathy, hemorrhagic cystitis, multifocal leukoencephalopathy, some types of cancer and also probably multiple sclerosis. This review describes the general aspects of human polyomavirus infections and pathogenicity. Commonly used diagnostic and therapeutic procedures in the field are also discussed.

1. Introduction. 2. Polyomavirus morphology. 3. Respiratory tract infection. 4. Polyomavirus nephropathy. 5. Hemorrhagic cystitis. 6. Multifocal leukoencephalopathy. 7. JC virus and multiple sclerosis. 8. Human polyomaviruses and cancer. 9. Diagnostics of polyomaviral diseases. 10. Treatment of polyomavirus infections. 11. Prevention and prophylaxis. 12. Summary

Słowa kluczowe: poliomawirusy ludzkie, immunosupresja, zakażenie
Key words: human polyomaviruses, immunosuppression, infection

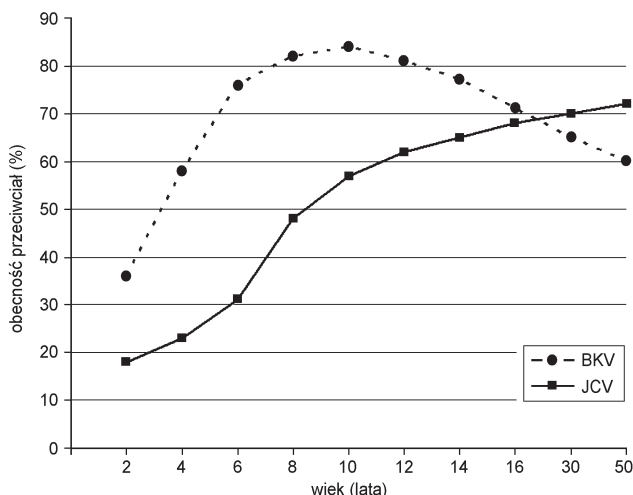
1. Wstęp

Poliomawirusy, należące do rodziny *Polyomaviridae*, powodują zakażenia wielu różnych gatunków ssaków, w tym również człowieka [6]. Obecnie znanych jest 5 poliomawirusów ludzkich: wirus BK (BKV), wirus JC (JCV), wirus WU (WUV), wirus KI (KIV) oraz poliomawirus komórek Merckela (MCV) [24]. Poliomawirusy ludzkie po raz pierwszy odkryto w roku 1971, gdy z mózgu osoby chorej na postępującą wieloogniskową leukoencefalopatię (progressive multifocal leukoencephalopathy – PML) wyizolowano wirusa JC, a BKV z moczu pacjenta po allogenicznym przeszczepieniu nerki [37, 51]. W roku 2007 dwa niezależne zespoły ze Szwecji (Karolinska Institutet) oraz ze Stanów Zjednoczonych (Washington University), wyizolowały z materiałów klinicznych pochodzących z układu oddechowego dwa kolejne poliomawirusy ludzkie: KI oraz WU [29, 42]. Niedługo po tym odkryciu, w roku 2008, w zmienionych nowotworowo komórkach Merckela zidentyfikowany został następny poliomawirus człowieka – MCV [11]. Określenia BKV oraz JCV pochodzą od inicjałów pacjentów, od których zostały po raz pierw-

szy wyizolowane, natomiast poliomawirusy WU oraz KI nazwano od instytucji, w których zostały wykryte [44]. Jedynie nazewnictwo MCV odbiega od tradycyjnego nazewnictwa opartego na pochodzeniu i wywodzi się z rodzaju komórek nowotworowych, w których po raz pierwszy zidentyfikowano ten patogen [23].

Zakażenia poliomawirusami są szeroko rozpowszechnione u ludzi i zwierząt, a zakażenia pierwotne mają zwykle przebieg bezobjawowy. Szacuje się, że ponad 80% populacji osób dorosłych ma wykrywalne przeciwciała przeciwko poliomawirusom BK oraz JC [2, 33, 35]. Zakażenia BKV, KIV oraz WUV zazwyczaj mają miejsce we wczesnym dzieciństwie, natomiast JCV kilka do kilkunastu lat później [1, 6]. Drogi transmisji poliomawirusów nie zostały do końca poznane; sugeruje się, że wirusy te przenoszone są drogą oddechową, fekalno-oralną, a także wraz z krwią i przeszczepianym narządem [6, 22]. W następstwie zakażeń w wieku dziecięcym wirusy te przedostają się do różnych tkanek, gdzie powodują zakażenie przetrwałe [22]. Za główne miejsce persystencji BKV i JCV uważa się tkanki układu moczowego, natomiast KIV i WUV – tkanki układu oddechowego [1, 23, 42]. Poliomawirusy ulegają reaktywacji

* Autor korespondencyjny: Sylwia Rynans, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny; ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa; tel: 022 628 27 39; e-mail: sylwia.rynans@gmail.com



Rys. 1. Częstość występowania przeciwciał przeciwko poliomawirusom BK i JC w odniesieniu do wieku osób badanych [wg 2, 33]

w wyniku osłabienia układu immunologicznego, głównie na skutek immunosupresji związanej z przeszczepieniem organów [6, 49]. Wówczas mogą one powodować zakażenia układu oddechowego (KIV, WUV), śródmiąższowe zapalenie nerki przeszczepionej (BKV), krwotoczne zapalenie pęcherza (BKV), postępującą wielogniskową leukoencefalopatię (JCV) [13, 23]. Są także prawdopodobnie zaangażowane w patogenezę stwardnienia rozsianego (JCV), a także niektórych chorób nowotworowych (JCV, MCV) [13, 23]. JCV oraz BKV wykryto w nerkach, migdałkach oraz leukocytach, a JCV dodatkowo w tkankach płuc uzyskanych od pacjentów z postępującą wielogniskową leukoencefalopatią. KIV oraz WUV można wyizolować z materiałów klinicznych układu oddechowego, a także z tkanki limfoidalnej pacjentów poddanych immunosupresji [29].

2. Ogólna budowa poliomawirusów

Genom poliomawirusów stanowi kolisty, dwuniciowy DNA zawierający ok. 5000 par zasad (pz). Jest on zamknięty w ikozaedralnym kapsydie o średnicy ok. 40–45 nm złożonym z 72 kapsomerów i pozbawionym osłonki. Wirusowe DNA zawiera 3 różne funkcjonalnie regiony: wczesny i późny region kodujący oraz niekodujący region regulatorowy. Region regulatorowy zawiera miejsce początku replikacji DNA oraz czynniki transkrypcyjne regulujące ekspresję genów wczesnych oraz późnych [6]. Region wczesny, transkrybowany przed replikacją DNA, koduje dwa białka niestrukturalne tzw. duży i mały antygen T, natomiast region późny koduje białka kapsydu VP1, VP2, VP3 oraz niestrukturalną agnoproteinę [8]. Genomy BKV oraz JCV wykazują względem siebie ok. 72% homologii [10].

DNA poliomawirusa BK zawiera 5153 pz. Na podstawie różnic w sekwencji nukleotydowej genomu, wyróż-

niamy 4 podtypy wirusa oznaczone od I do IV, w tym 4 podgrupy w obrębie podtypu I (a, b1, b2, c) [28]. BKV wiąże się do powierzchni komórki gospodarza przez receptor, który stanowi glikoproteina zawierająca łańcuchy N-glikanowe. Po endocytozie wirusa jego cząstki transportowane są do jądra komórkowego poprzez retikulum endoplazmatyczne. Białka kapsydu są usuwane przed wniknięciem DNA do jądra komórkowego, w którym następuje proces transkrypcji. Pojawienie się antygeny T w komórkach permissywnych powoduje przejście infekcji w zakażenie produktywne. Antygen T (T-Ag) występuje w przeważającej części (95%) w jądrze komórki gospodarza w formie wolnej lub związanej z komórkowym DNA. T-Ag jest podstawowym białkiem wirusowym, niezbędnym do replikacji wirusowego materiału genetycznego. Ma ono także zdolność do regulacji cyklu komórkowego, przez bezpośredni wpływ na komórkowe czynniki transkrypcyjne, takie jak c-Jun czy c-Fos [26]. Nowe wiriony składane są ze zreplikowanego wirusowego DNA oraz białek strukturalnych VP1, VP2 oraz VP3. Wydostają się one z komórki poprzez jej lizę, aczkolwiek przy zakażeniach persystentnych można je także wykryć w pęcherzykach znajdujących się wewnątrz cytoplazmy [22].

Genom wirusa JC zawiera DNA o długości 5130 pz, a jego dwustronna organizacja przypomina organizację genomu BKV [19]. JCV ulega adsorpcji do komórki poprzez wiązanie reszt kwasu sialowego, a jego receptorem jest najprawdopodobniej receptor serotoninowy 5HT2AR [41]. Wirus dostaje się do komórek na drodze endocytozy i transportowany jest do jądra komórkowego w którym zachodzi replikacja DNA oraz transkrypcja genów wczesnych i późnych [25]. Wyróżniamy dwa warianty JCV: archetypowy oraz przestawiony. Forma archetypowa zawiera niezmienny region regulatorowy i wykrywana jest zwykle w moczu. W wyniku mutacji niektórych sekwencji regulatorowych, powstaje wariant „przestawiony”, o innym tropizmie tkankowym oraz wyższym potencjale patogennym, przez co może powodować rozwój chorób takich jak postępująca wielogniskowa leukoencefalopatia [26].

Wirusy KI oraz WU zaklasyfikowano do poliomawirusów ludzkich ze względu na wysoką homologię oraz podobieństwo w organizacji genomu do poliomawirusów BK i JC. Mają one regiony kodujące antygeny T oraz białka strukturalne VP1, VP2 i VP3, nie kodują jednak białka niestrukturalnego agnoproteiny [11]. KIV oraz WUV wykazują wysoką homologię we wczesnym regionie kodującym, natomiast ich regiony późne znacznie się różnią [4]. Genom wirusa KI zawiera 5040 pz, natomiast wirusa WU – 5229 pz [45].

Spośród ludzkich poliomawirusów MCV ma największy genom, który zawiera 5387 pz [17]. Duży antygen T wirusa wykazuje jedynie 30% homologii w stosunku do dużego antygeny T kodowanego przez pozost-

stałe poliomawirusy. Zwiększa to możliwości MCV do wiązania białka p53 oraz integracji wirusowego DNA do DNA ludzkiego, co sprzyja procesom nowotworzenia w komórkach Merckela. Podobnie jak u wirusów JC oraz WU, genom MKV nie koduje agnoproteiny [24].

3. Zakażenia układu oddechowego

Zakażenia układu oddechowego, powodowane przez WUV oraz KIV, występują najczęściej u kilkuletnich dzieci, ale także u pacjentów powyżej 45 roku życia [39]. Szacuje się, że poliomawirusy KI powodują ok. 1–2,5% zakażeń układu oddechowego, natomiast poliomawirusy WU 3–7% zakażeń układu oddechowego u dzieci poniżej 4 roku życia [38]. W badaniach przeprowadzonych przez Neske i wsp. poliomawirus WU został wykryty w 4,9% próbek popłuczyn gardłowych uzyskanych od dzieci hospitalizowanych z powodu ostrych zakażeń układu oddechowego. Obecność DNA wirusa stwierdzono głównie w próbkach pochodzących od pacjentów poniżej 4 roku życia, co wskazuje na większą częstość zakażeń u dzieci w wieku przedszkolnym [40]. Detekcja KIV oraz WUV związana jest zazwyczaj ze współzakażeniem innymi wirusami, powodującymi infekcje układu oddechowego. Najczęściej wykrywanymi patogenami są w tym przypadku rinowirusy oraz bokawirusy ludzkie, nieco rzadziej adenowirusy [39].

4. Śródmiąższowe zapalenie nerki przeszczepionej

Poliomawirus BK jest rozpoznawany jako główny czynnik etiologiczny śródmiąższowego zapalenia nerki u pacjentów po allogenicznym przeszczepieniu tego narządu. Reaktywacja wirusa w wyniku immunosupresji może prowadzić do rozwoju nefropatii u 2–9% biorców, która jest przyczyną odrzucenia przeszczepu w 30–60% przypadkach [52]. Częstość występowania nefropatii związanej z zakażeniem BKV (BK virus nephropathy – BKVN) znacznie wzrosła w ostatnich latach, co może być związane z wprowadzaniem nowych leków immunosupresyjnych, wzrostem liczby zabiegów transplantacyjnych, a także rozwojem nowych technik diagnostycznych [53]. Czynnikiem ryzyka choroby mogą być: obecność przeciwciał anti-BKV u dawcy narządu, niezgodność antygenów tkankowych HLA dawcy oraz biorcy, starszy wiek pacjenta czy też płeć męska [23]. Do reaktywacji BKV dochodzi zazwyczaj w pierwszym roku po transplantacji. BKVN została najwcześniej zdiagnozowana już w 6 dniu, natomiast najpóźniej w 6 lat po przeszczepieniu [8]. Do tej pory nie ustalono, czy nefropatie BKV są wynikiem reaktywacji zakażeń persistentnych, czy też mogą być powodowane przez nadkażenia poliomawirusami pochodzącymi od dawcy narządu [34].

Nefropatia związana z zakażeniem poliomawirusem BK charakteryzuje się nekrozą kanalików proksymalnych nerki oraz denudacją błony podstawnej nabłonka, wynikających z zakażenia litycznego komórek nabłonkowych nerki [23]. Śródmiąższowe zapalenie nerki jest chorobą przewlekłą oraz skąpobjawową, dlatego też jest trudno odróżnialne od ostrego odrzucania przeszczepu. Ostateczną diagnozę można postawić dopiero po wykonaniu biopsji nerki oraz zaobserwowaniu efektu cytotropycznego w komórkach nabłonkowych kanalików nerkowych [9].

W trakcie rozwoju choroby możemy wyróżnić jej trzy progresywne stadia. Początkowo wirusowe DNA jest wykrywalne w moczu, następnie w surowicy oraz ostatecznie w nerkach pacjenta [6, 47]. Wiremia BKV wykrywalna jest w surowicy większości pacjentów z aktywną nefropatią. Niektóre raporty wskazują na obecność wiremii oraz wirurii nawet u 77% pacjentów po przeszczepieniu nerki. W badaniach przeprowadzonych przez Koukoulaki i wsp. wiremię BKV wykryto w 14%, natomiast wirurię BKV w 25% próbek pochodzących od 32 pacjentów po transplantacji nerki. Obserwacje te potwierdzają, że miejscem zapoczątkowania replikacji wirusa jest układ moczowy [27].

Pacjenci po przeszczepieniu nerki, u których doszło do rozwoju nefropatii, stanowią grupę ryzyka rozwoju choroby nowotworowej. Potrzebne są jednak dokładniejsze badania stwierdzające, czy proces nowotworzenia związany jest z zakażeniem poliomawirusami, czy też wynika z immunosupresji [7].

5. Krwotoczne zapalenie pęcherza

Reaktywacja zakażenia poliomawirusem BK u pacjentów po allogenicznym przeszczepieniu komórek krwiotwórczych (Hematopoietic Stem Cell Transplantation – HSCT) może powodować rozwój krwotoczno-zapalenia pęcherza moczowego (Hemorrhagic cystitis – HC) w 5–40% przypadków [20]. HC u pacjentów hematologicznych objawia się różnostopniową hematurią oraz bolesnym lub utrudnionym oddawaniem moczu [23]. Na podstawie ostrości hematurii krwotoczno-zapalenie pęcherza można podzielić na cztery stopnie. Z pierwszym stopniem mamy do czynienia przy mikro-, a ze stopniem drugim przy makrohaturii. Trzeci stopień choroby jest obserwowany przy hematurii z widocznymi skrzepami, natomiast stopień czwarty przy makrohaturii z widoczną skrzepliną oraz uszkodzeniem funkcji nerek. Przebieg kliniczny choroby może być łagodny, umiarkowany lub ciężki [31].

Zakażenie BKV zostało po raz pierwszy powiązane z krwotocznym zapaleniem pęcherza w roku 1976, gdy w moczu pacjenta z HC w mikroskopii elektronowej wykryto cząstki wirusowe podobne do papowawirusów.

Już po 10 latach wiadano, że wiruria BKV u pacjentów po HSCT jest powiązana z rozwojem HC [32]. W badaniach przeprowadzonych przez Leung i wsp. dowiedziano, że poziom wirurii u pacjentów z HC jest znacznie wyższy niż w przypadku pacjentów po HSCT wykazujących wirurię, ale u których nie doszło do rozwoju HC. U pacjentów bez HC, poziom wirurii BKV po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych wynosił ok. 10^4 – 10^5 kopii/ml, natomiast u pacjentów chorych na krwotoczne zapalenie pęcherza – 10^8 – 10^{10} kopii/ml [30].

Krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego u pacjentów po transplantacji komórek krwiotwórczych rozwija się głównie w późnym okresie poprzyszczepowym [14]. Jednakże do rozwoju HC może dojść nawet w kilka dni po transplantacji. W badaniach przeprowadzonych przez Erardi i wsp., spośród 33% biorców allogenicznego przeszczepu komórek krwiotwórczych u których wykryto wirurię BKV, do rozwoju HC doszło u 43% pacjentów, średnio w 9 dniu po przeszczepieniu. Krwotoczne zapalenie pęcherza u tych osób skorelowane było m.in. ze zmniejszoną liczbą płytek krwi [16].

Potencjalnymi czynnikami ryzyka rozwoju krwotoczego zapalenia pęcherza związanego z reaktywacją zakażenia BKV są: rodzaj zastosowanych leków immunosupresyjnych, podtyp poliomawirusa BK, poziom wirurii, a także, zwłaszcza u pacjentów pediatrycznych, występowanie choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (Graft-versus-host disease – GvHD) [14, 21].

6. Postępująca wielogniskowa leukoencefalopatia

Poliomawirus JC jest czynnikiem etiologicznym zespołu klinicznego znanego jako postępująca wielogniskowa leukoencefalopatia (PML). Jest on zaburzeniem powodującym demielinizację tkanki nerwowej centralnego układu nerwowego oraz pojawieniem się oligodendrocytów o nieprawidłowej budowie, będących głównym miejscem aktywnego zakażenia JCV. PML charakteryzuje się niedowładem połowicznym, demencją lub otępieniem, zaburzeniami mowy oraz widzenia [26]. Objawy nasilają się w trakcie trwania choroby, która w ciągu 3 do 6 miesięcy może spowodować zgon pacjenta. Nie jest do końca jasne czy zakażenie mózgu spowodowane przez JCV wynika z reaktywacji wirusa, czy też jest zakażeniem de novo [23]. Według Focosi i wsp. zakażenie JCV u pacjentów hematologicznych po przeszczepie komórek krwiotwórczych jest znaczącym czynnikiem ryzyka rozwoju PML [18].

Postępująca wielogniskowa leukoencefalopatia rozwija się często u osób zakażonych HIV oraz pacjentów poddanych immunosupresji. Liczba pacjentów z HIV chorych na PML wynosi ok. 5%, aczkolwiek obecnie odsetek ten utrzymuje się na stałym poziomie na skutek wprowadzenia wysoce efektywnej terapii antyretrowiru-

sowej (Highly Active Antiretroviral Therapy – HAART) [6]. Związek pomiędzy PML indukowanym zakażeniem JCV, a zakażeniem HIV nie jest do końca jasny. Obniżenie poziomu oraz osłabienie funkcji limfocytów T CD4⁺ może aktywować replikację JCV. Zakażenie HIV może również powodować załamanie się bariery krew-mózg, co umożliwi penetrację do tkanek mózgu limfocytom B zakażonym poliomawirusem JC. Kolejną hipotezą jest produkcja licznych cytokin w centralnym układzie nerwowym w odpowiedzi na zakażenie HIV, która może zainicjować aktywację promotora genu regulatorowego JCV [23].

Zmiany demielinizacyjne mózgu obrazowane są przy udziale rezonansu magnetycznego, aczkolwiek ostateczne rozpoznanie PML wymaga przeprowadzenia biopsji mózgu. W badaniach histopatologicznych stwierdza się ogniska demielinizacyjne w warstwie podkorowej istoty białej, nacieki komórkami eozynofilnymi, a także powiększone jądra komórek gąbczastych i astrocytów. Rozpoznanie choroby można potwierdzić wykazując przy pomocy mikroskopii elektronowej obecność JCV w ciałkach wtrętowych wewnątrz oligodendrocytów [25].

7. Stwardnienie rozsiane

Poliomawirus JC ma również stwierdzoną unikalną zdolność do wiązania komórek gąbczastych. Właściwość ta, wraz z wysoką zakaźnością wirusa oraz jego zdolnością do wywoływania zakażeń persystentnych, skłoniła do postawienia hipotezy, iż wirus ten może powodować rozwój stwardnienia rozsianego [25]. Istnieje kilka sprzecznych raportów dotyczących wirurii JCV u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym. Niektórzy autorzy podają, że wykryli poliomawirusa JC w płynie mózgowo-rdzeniowym pobranym od pacjentów ze stwardnieniem rozsianym, inni z kolei wskazują na brak dowodów, iż zakażenia JCV związane są z rozwojem choroby [23].

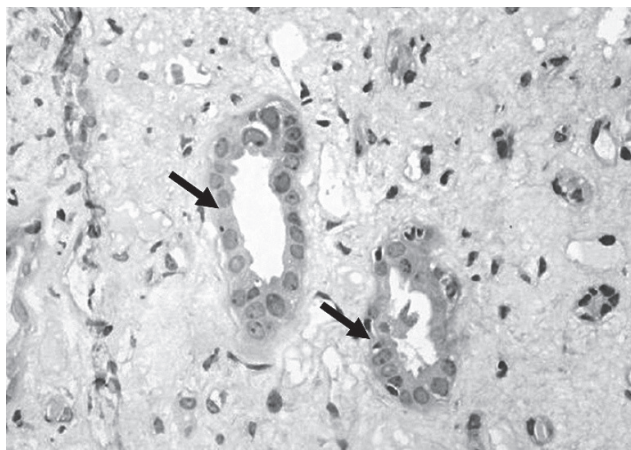
8. Choroby nowotworowe powodowane przez poliomawirusy ludzkie

Ważną grupą schorzeń, które mogą powodować poliomawirusy ludzkie są choroby nowotworowe. JCV może prawdopodobnie mieć udział w powstawaniu nowotworów przewodu pokarmowego oraz guzów mózgu [26], natomiast MCV jest czynnikiem etiologicznym nowotworów komórek Merkela (Merkel Cell Carcinoma – MCC) [17]. Nefropatie BKV mogą być także znaczącym czynnikiem ryzyka rozwoju nowotworów [7]. Jak dotąd nie ustalono czy KIV oraz WUV mają właściwości onkogenne [56].

Obecność sekwencji antygeny T wirusa JC wykazano w licznych badaniach nad nowotworami przewodu pokarmowego, w tym raku przełyku, żołądka, jelita oraz okrężnicy [26]. Przepuszczalnie są dwa mechanizmy transformacji nowotworowej związanej z zakażeniem poliomawirusem JC. Pierwszy z nich polega na uaktywnieniu się obecnego w przewodzie pokarmowym JCV w przypadku pojawienia się zmian nowotworowych. Drugi mechanizm zakłada zapoczątkowanie nowotworzenia bezpośrednio przez JCV oraz związane z tym uszkodzenie DNA ludzkiego przez duży antygen T. W badaniu przeprowadzonym na 100 próbkach zmienionych nowotworowo fragmentów okrężnicy, sekwencje dużego antygeny T poliomawirusa JC stwierdzono w 56% przypadków. Podobną częstość detekcji JCV obserwuje się w innych badaniach nad występowaniem tego wirusa w zmienionych nowotworowo tkankach przełyku czy też żołądka [26].

Szacuje się, że ok. 69% pacjentów z różnymi guzami mózgu zawiera sekwencje wczesnych genów JCV, co sugeruje udział wirusa w etiologii tego rodzaju nowotworów. W rozwoju guzów mózgu najprawdopodobniej uczestniczą agnoproteina oraz mały i duży antygen T poliomawirusa JC. Rola JCV w rozwoju guzów mózgu jest jednak kontrowersyjna. Niektórzy autorzy podają, że specyficzne sekwencje wirusa stwierdzono w ponad 40% przypadków badanych pacjentów; natomiast w innych badaniach częstość ta wynosi zaledwie kilka procent [26].

Nowotwór komórek Merckela występuje rzadko, ale jest jedną z najbardziej agresywnych postaci neuroektodermalnego raka skóry [56]. Rolę poliomawirusa komórek Merckela w rozwoju MCC opisali Feng i wsp. [17]. Przeprowadzili oni badanie na próbkach pochodzących od 10 pacjentów chorych na MCC oraz od 84 pacjentów zgrupowanych w 2 grupy kontrolne. Pierwszą grupę kontrolną stanowiło 59 osób, od których pobrano



Rys. 2. Efekt cytopatyczny wywołany przez poliomawirusa BK w nerce przeszczepionej. Strzałki wskazują komórki, które przybrały rurkowaty kształt pod wpływem wirusa. Powiększenie mikroskopu x400 (badania własne)

różne próbki tkanek, w tym 9 próbek skóry. Druga grupa kontrolna skupiała 25 pacjentów nie wykazujących MCC, od których pobrano próbki zdrowej lub zmienionej nowotworowo skóry. Obecność sekwencji genomowych MCV stwierdzono u 8 z 10 pacjentów grupy badanej, natomiast w obu grupach kontrolnych zaledwie w 8% i 16% próbek. U 6, spośród 8 pacjentów z MCC zakażonych MCV, nastąpiła integracja wirusowego DNA do DNA komórek zmienionych nowotworowo, co sugeruje, że zakażenie oraz integracja MCV może powodować klonalną ekspansję komórek nowotworowych [17]. Obserwacje te zostały potwierdzone przez innych autorów, którzy w swych pracach wykazują zbliżoną częstość występowania zakażeń MCV u pacjentów z nowotworem komórek Merckela sięgającą ok. 80% [24]. Obecność MCV w zmienionych nowotworowo komórkach Merckela może wpływać na kliniczny przebieg choroby, gdyż zaobserwowano, że pacjenci MCV-pozytywni żyją od 3 do 5 lat dłużej niż pacjenci MCV-negatywni [24].

9. Diagnostyka zakażeń ludzkimi poliomawirusami

Zważywszy na ciągły wzrost częstości zakażeń poliomawirusami ludzkimi potrzebne są skuteczne metody detekcji oraz monitorowania tych zakażeń. Do diagnostyki zakażeń BKV oraz JCV wykorzystuje się hodowle komórkowe, reakcje serologiczne, badanie cytologiczne osadów moczu, przeszskórną biopsję cienkoigłową oraz metody biologii molekularnej [8].

Hodowle komórkowe stanowią tanią oraz łatwą metodą służącą do detekcji poliomawirusa BK. Aczkolwiek, z powodu ograniczeń czasowych, technika ta wykorzystywana jest niemal wyłącznie w badaniach naukowych [8]. Jak dotąd nie zidentyfikowano linii komórkowych wrażliwych na zakażenia WUV, KIV oraz MCV [11].

Przez wiele lat, „złotym standardem” w wykrywaniu zakażeń BKV było przeprowadzanie biopsji nerek oraz identyfikacja wtrętów wirusowych w komórkach epitelialnych kanalików nerkowych [43]. Zmiany w zakażonych komórkach epitelialnych mogą być potwierdzone przy zastosowaniu mikroskopii elektronowej. Analiza ta umożliwia dostrzeżenie wewnątrzkomórkowych, ułożonych równolegle gęsto upakowanych skupisk wirionów o średnicy 40–45 nm [8]. Stwierdzenie akumulacji tysięcy cząsteczek wirusowych przed całkowitą lizą komórki potwierdza rolę efektu cytopatycznego w rozwoju nefropatii BKV po transplantacji nerki [10]. W diagnostyce postępującej leukencefalopatii wieloogniskowej należy przeprowadzić biopsję mózgu. Szacuje się, że czułość tej metody wynosi 64–96%, aczkolwiek w wielu przypadkach może ona powodować zgon pacjenta. Barwienie immunohistochemiczne tkanki wykonuje się przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciwko antygenowi T poliomawirusa SV 40. Badanie histopatologiczne

potwierdza obecność ognisk demielinizacyjnych w warstwie podkorowej istoty białej. W mikroskopie elektronowym możemy dodatkowo zaobserwować obecność JCV w ciążkach inkluzyjnych oligodendrocytów [6].

Do metod serologicznych służących do wykrywania poliomawirusów możemy zaliczyć: test zahamowania hemaglutynacji, test immunoenzymatyczny ELISA, odczyn neutralizacji oraz oznaczenia multiparametryczne na platformie Luminex, będącej udoskonaleniem testu ELISA. Każda z wymienionych metod serologicznych posiada pewne ograniczenia, dlatego też ich porównywanie może być niewspółmierne. Preferowaną metodą serologiczną do detekcji zakażeń poliomawirusami ludzkimi są testy ELISA oraz ich modyfikacja [11]. Do detekcji przeciwciał w teście ELISA wykorzystywane są rekombinowane antygeny VP1. Istnieją doniesienia o reaktywności krzyżowej przeciwciał anti-WUV z przeciwciałami anti-KIV, anti-JCV oraz anti-BKV, aczkolwiek badania przeprowadzone przez Ng u y e n i wsp. wykazały, że reaktywność ta jest minimalna i nie powoduje obniżenia czułości metody [42]. Oznaczenia multiparametryczne z użyciem platformy Luminex pozwalają na zwiększenie efektywności oraz jakości wykonywanych oznaczeń, przy jednoczesnym zmniejszeniu nakładu pracy oraz czasu w porównaniu do tradycyjnych testów immunoenzymatycznych. Przy zastosowaniu tej metody możliwe jest jednoczesne wykrywanie wielu antygenów w pojedynczym dołku płytki pomiarowej [11].

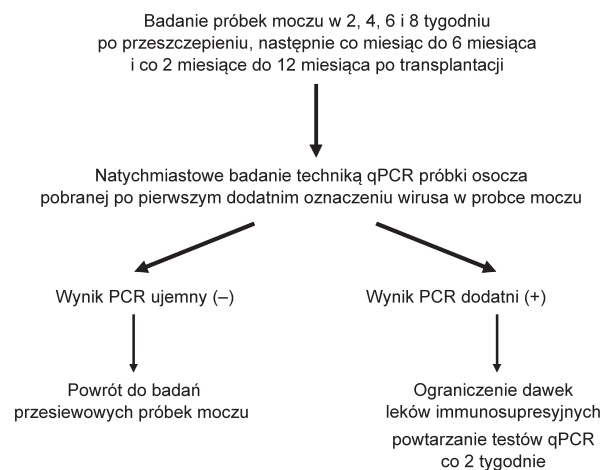
Przeprowadzenie badania cytologicznego moczu umożliwia identyfikację tzw. *decoy cells*, czyli wydalanych z moczem, apoptotycznych komórek epitelialnych nerki z charakterystycznymi wtrętami wirusowymi obecnymi w jądrze komórkowym [8]. Komórki te wykrywane są w osadzie moczu po zabarwieniu metodą Papanicolaou. Cytologia jest szybką i prostą metodą pozwalającą wykluczyć nefropatię BKV gdy nie stwierdzamy obecności *decoy cells* w moczach. W przypadku pacjentów po przeszczepieniu nerki, obecność tych komórek może świadczyć o reaktywacji wirusa bez znacznego uszkodzenia kanalików nerkowych, jak i o rozwoju śródmiąższowego zapalenia nerki [8].

Z racji ogniskowej natury zakażeń poliomawirusami wynik biopsji może być fałszywie negatywny, gdyż fragment badanej tkanki może nie być reprezentatywny. Użycie metod mniej inwazyjnych, takich jak badanie cytologiczne czy mikroskopia elektronowa jest ograniczone przez szerokie rozpowszechnienie wirusa w populacji. Dlatego też coraz częściej w detekcji zakażeń poliomawirusami ludzkimi wykorzystywane są metody biologii molekularnej [43].

Lancuchowa reakcja polimerazy (PCR) umożliwia powielenie materiału genetycznego poliomawirusów dzięki obecności specyficznych starterów. DNA poliomawirusów możemy izolować z próbek pochodzących z różnych kompartmentów ciała. Do detekcji zakażeń

układu oddechowego możemy użyć próbek popłuczyn gardłowych lub popłuczyn pęcherzykowo-oskrzelowych. DNA poliomawirusów możemy wykrywać również w próbkach krwi, płynu mózgowo-rdzeniowego, moczu czy też kału [5]. Czułość detekcji DNA JCV w próbkach płynu mózgowo-rdzeniowego przy zastosowaniu PCR sięga 72–92%, natomiast swoistość reakcji może wynosić od 92 do 100% [6]. Konwencjonalny PCR posiada jednak wiele ograniczeń. Główną wadą reakcji jest brak dokładnej informacji ilościowej. Związane jest to ze zmienną wydajnością amplifikacji pomiędzy kolejnymi cyklami, a także obecnością inhibitorów reakcji – zwłaszcza w jej ostatnich etapach. Te czynniki mogą prowadzić do uzyskania częstych wyników fałszywie negatywnych. Ograniczenia te pozwalają przewyższyć zastosowanie PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR, qPCR) [35, 36]. Real-time PCR wymaga minimalnej ilości matrycy, a także pozwala określić dokładną liczbę kopii materiału genetycznego wirusa w próbce. Real-time PCR pozwala zwiększyć czułość metody, minimalizuje ryzyko kontaminacji próbek oraz eliminuje etap poamplifikacyjnej obróbki powielonego produktu [15, 54].

Ze względu na szereg zalet, reakcja PCR w czasie rzeczywistym powinna być stosowana w rutynowej diagnostyce oraz monitorowaniu zakażeń wirusowych u biorców narządów [12]. Choć biopsje narządów są potrzebne do rozpoznania, ze względu na swoją inwazyjność nie są idealnym narzędziem do monitorowania infekcji. Zakażenia ogniskowe powodują, że wykrywamy poliomawirusy w mniejszej liczbie próbek klinicznych, mimo iż większość dorosłych posiada przeciwciała, świadczące o uprzedniej ekspozycji na BKV. Do monitorowania zakażeń poliomawirusami u biorców alogenicznych przeszczepów nerki racjonalne jest użycie moczu, gdyż reprezentuje on materiał z całej nerki [48]. Przy zastosowaniu techniki real-time PCR można wykryć zakażenia poliomawirusami przed wystąpieniem



Rys. 3. Zalecany schemat monitorowania zakażeń poliomawirusami u pacjentów poddanych przeszczepieniu nerki [wg 9, 36]

niem jakichkolwiek objawów klinicznych. Ilościowe oznaczanie liczby kopii wirusa w próbce umożliwia monitorowanie postępu zakażenia oraz zaklasyfikowanie pacjenta do grupy ryzyka rozwoju nefropatii. Monitorowanie obecności wirusa, poprzez częste oznaczanie ilościowe jego kopii w materiale klinicznym, pozwala także badać skuteczność terapii przeciwwirusowej [43].

10. Terapia zakażeń poliomawirusami

W związku z rosnącą liczbą osób chorych na AIDS oraz wykonywanych zabiegów transplantacyjnych nabiera znaczenia problem zakażeń poliomawirusami ludzkimi oraz potrzeba skutecznej terapii tych zakażeń. Jednak jak dotąd nie ma formalnie zatwierdzonych leków przeciwko poliomawirusom ludzkim.

W przypadku pacjentów poddanych zabiegom transplantacyjnym, obniża się dawki leków immunosupresyjnych, aby organizm sam mógł zwalczyć zakażenie. Stwarza to jednak ryzyko ostrego odrzucenia przeszczepu i nie jest efektywne u wszystkich osób. W niektórych badaniach klinicznych wykazano skuteczność cidofoviru, leflunomidu oraz fluorochinolonów zastosowanych u pacjentów ze śródmiąższowym zapaleniem nerki oraz krwotocznym zapaleniem pęcherza. Brak jest jednak konkretnych danych potwierdzających skuteczność tych preparatów [23].

Cidofovir jest analogiem nukleotydowym cytozyny, hamującym wirusową polimerazę DNA, który stosowany jest w terapii zakażeń wirusem cytomegalii (CMV) u pacjentów zakażonych HIV [3]. Jednakże mechanizm hamowania replikacji BKV przez ten lek nie jest znany, gdyż genom poliomawirusa BK nie koduje polimerazy DNA. Jego skuteczność przeciwwirusowa może być spowodowana zahamowaniem syntezy wirusowego DNA lub inhibicją domeny funkcjonalnej dużego antygeny T wirusa, posiadającego aktywność polimerazy DNA. Użycie cidofoviru może powodować istotną nefrotoksyczność, jakkolwiek istnieją doniesienia o jego skuteczności u pacjentów po przeszczepieniu nerki, u których rozwinęła się nefropatia oraz krwotoczne zapalenie pęcherza [14]. W badaniach przeprowadzonych przez Savonę i wsp. podawano niskie dawki cidofoviru 19 pacjentom po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych u których rozwinęło się krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego. Poprawa stanu klinicznego nastąpiła u 84% pacjentów, natomiast obniżenie poziomu wirurii zaobserwowano zaledwie u 47% pacjentów [50]. Z kolei Wu i wsp. wykazali brak skuteczności terapii cidofowirem u 14 pacjentów po transplantacji nerki u których doszło do rozwoju nefropatii BKV [55].

Leflunomid jest lekiem immunosupresyjnym zatwierdzonym w terapii reumatoidalnego zapalenia stawów. Jego aktywność immunosupresyjna wynika z hamo-

wania aktywności kinazy białkowej oraz biosyntezy pirymidyn. Lek ten wykazuje także pewną aktywność przeciwwirusową *in vitro* w stosunku do CMV, wirusa opryszczki (HSV) oraz BKV. Jak dotąd w literaturze nie pojawiły się żadne doniesienia o stosowaniu leflunomidu u chorych na krwotoczne zapalenie pęcherza powiązane z zakażeniem poliomawirusowi BK, aczkolwiek zważywszy na jego aktywność *in vitro* przeciw BKV, postulowane jest jego potencjalne użycie w leczeniu tego schorzenia [14].

Aktywność *in vitro* przeciw poliomawirusom BK wykazują również fluorochinolony, antybiotyki hamujące replikację komórek bakteryjnych poprzez inhibicję aktywności topoisomerazy typu II, w tym gyrazy oraz topoisomerazy IV. Uważa się, że inhibitory gyrazy DNA mogą hamować replikację BKV poprzez inhibicję aktywności helikazy dużego antygeny T poliomawirusa, pełniącej funkcje zbliżone do gyrazy DNA [14]. W nierandomizowanym badaniu klinicznym, po podaniu ciprofloksacyny zauważono spadek wirurii u pacjentów, aczkolwiek nie korelowało to z redukcją przypadków krwotocznego zapalenia pęcherza. Fluorochinolony powinny być wobec tego stosowane nie jako czynniki terapeutyczne, a raczej w celu profilaktyki zakażeń BKV [21].

Nie istnieją również skuteczne leki przeciwwirusowe, które byłyby skierowane przeciwko JCV. U pacjentów zakażonych HIV, u których rozwinęła się PML rozpoczęcie HAART lub optymalizacja terapii, obniża poziom replikacji JCV, natomiast u biorców narządów z PML należy ograniczyć lub przerwać podawanie leków immunosupresyjnych [6].

W przypadku nowo odkrytych poliomawirusów ludzkich ważne jest poznanie ich biologii, dróg transmisji oraz epidemiologii. Być może wówczas zostanie odkryty skuteczny lek przeciwwirusowy hamujący replikację KIV, WUV oraz MCV [23].

11. Profilaktyka

Jak dotąd nie wynaleziono skutecznej szczepionki chroniącej przed zakażeniami poliomawirusami ludzkimi [23]. Istnieje możliwość skonstruowania szczepionek na bazie niewywołujących zakażenia cząstek wirusopodobnych (VLP, virus-like particles), podobnie jak stało się to w przypadku papillomawirusów. VLP są strukturalnie podobne do naturalnych wirionów, ale nie mają zdolności wywoływania choroby, ze względu na brak zakaźnego DNA. W przypadku szczepionek skierowanych przeciwko poliomawirusom czynnikiem immunogennym byłoby tu prawdopodobnie główne białko kapsydu VP1, syntetyzowane *in vitro* z udziałem wektora bakulowirusowego w hodowli komórek owadów lub z wykorzystaniem drożdży [46].

U pacjentów po przeszczepieniach nerek oraz komórek krwiotwórczych konieczna jest minimalizacja czynników ryzyka rozwoju chorób powodowanych przez poliomawirusy. Ważne jest jak najlepsze dopasowanie dawcy oraz biorcy, użycie mało toksycznych leków immunosupresyjnych, stałe monitorowanie wirerii oraz wirurii, zapobieganie rozwojowi GvHD, a także natychmiastowa terapia w przypadku reaktywacji wirusa w okresie potransplantacyjnym [21].

12. Podsumowanie

Poliomawirusy ludzkie są szeroko rozpowszechnione na całym świecie i atakują ok. 80% populacji. Większość chorób powodowanych przez BKV oraz JCV dotyczy dzieci i ma łagodny przebieg. Podobnie jest w przypadku dorosłych pacjentów immunokompetentnych. W obu przypadkach poliomawirusy mogą powodować zakażenia persystentne w komórkach nerek, tkankach limfoidalnych czy też w komórkach układu nerwowego. U pacjentów poddanych immunosupresji może dojść do reaktywacji wirusów oraz rozwoju chorób takich jak krwotoczne zapalenie pęcherza, śródmiażdżowe zapalenie nerki, postępująca leukencefalopatia wielogniskowa czy też stwardnienie rozsiane. Nowo odkryte poliomawirusy ludzkie KI i WU mogą powodować zakażenia układu oddechowego, natomiast MCV nowotworzenie w komórkach Merckela. Chociaż w ostatnich latach nastąpił rozwój metod diagnostycznych, ułatwiających identyfikację zakażeń, nadal brakuje skutecznych form terapii przeciwwirusowej. Stosowane w badaniach klinicznych cidofovir czy też leflunomid nie są formalnie zarejestrowanymi lekami. Ważne jest więc ograniczenie transmisji zakażeń oraz lepsze poznanie biologii, patogenyzy oraz dróg rozprzestrzeniania się, zwłaszcza niedawno odkrytych, poliomawirusów ludzkich.

Piśmiennictwo

1. Abedi Kiasari B., Vallely P.J., Corless C.E., Al-Hammadi M., Klapper P.E.: Age-related pattern of KI and WU polyomavirus infection. *J. Clin. Virol.* **43**, 123–125 (2008)
2. Antonsson A., Green A.C., Mallitt K.A., O'Rourke P.K., Pawlita M., Waterboer T., Neale R.E.: Prevalence and stability of antibodies to the BK and JC polyomaviruses: a long-term longitudinal study of Australians. *J. Gen. Virol.* **91**, 1849–1853 (2010)
3. Araya C.E., Lew J.F., Fennell R.S. 3rd, Neiberger R.E., Dharnidharka V.R.: Intermediate-dose cidofovir without probenecid in the treatment of BK virus allograft nephropathy. *Pediatr. Transplant.* **10**, 32–37 (2006)
4. Bialasiewicz S., Whiley D.M., Lambert S.B., Gould A., Nissen M.D., Sloots T.P.: Development and evaluation of real-time PCR assays for the detection of the newly identified KI and WU polyomaviruses. *J. Clin. Virol.* **40**, 9–14 (2007)
5. Bialasiewicz S., Whiley D.M., Lambert S.B., Nissen M.D., Sloots T.P.: Detection of BK, JC, WU, or KI polyomaviruses in faecal, urine, blood, cerebrospinal fluid and respiratory samples. *J. Clin. Virol.* **45**, 249–254 (2009)
6. Boothpur R., Brennan D.C.: Human polyoma viruses and disease with emphasis on clinical BK and JC. *J. Clin. Virol.* **47**, 306–312 (2010)
7. Chen C.H., Wen M.C., Wang M., Lian J.D., Cheng C.H., Wu M.J., Yu T.M., Chuang Y.W., Chang D., Shu K.H.: High incidence of malignancy in polyomavirus-associated nephropathy in renal transplant recipients. *Transplant. Proc.* **42**, 817–818 (2010)
8. Cimbaluk D., Pitelka L., Kluskens L., Gattuso P.: Update on human polyomavirus BK nephropathy. *Diagn. Cytopathol.* **37**, 773–779 (2009)
9. Costa C., Bergallo M., Astegiano S., Terlizzi M.E., Sidoti F., Segoloni G.P., Cavallo R.: Monitoring of BK virus replication in the first year following renal transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.* **23**, 3333–3336 (2008)
10. Costa C., Bergallo M., Sidoti F., Astegiano S., Terlizzi M.E., Mazzucco G., Segoloni G.P., Cavallo R.: Polyomaviruses BK and JC-DNA quantitation in kidney allograft biopsies. *J. Clin. Virol.* **44**, 20–23 (2009)
11. Dalianis T., Ramqvist T., Andreasson K., Kean J.M., Garcea R.L.: KI, WU and Merkel cell polyomaviruses: a new era for human polyomavirus research. *Semin. Cancer Biol.* **19**, 270–275 (2009)
12. Deback C., Géli J., Ait-Arkoub Z., Angleraud F., Gautheret-Dejean A., Agut H., Boutolleau D.: Use of the Roche Light-Cycler[®] 480 system in a routine laboratory setting for molecular diagnosis of opportunistic viral infections: Evaluation on whole blood specimens and proficiency panels. *J. Virol. Methods*, **159**, 291–294 (2009)
13. Debiaggi M., Canducci F., Brerra R., Sampaolo M., Marinuzzi M.C., Parea M., Arghittu M., Alessandrino E.P., Nava S., Nucleo E., Romero E., Clementi M.: Molecular epidemiology of KI and WU polyomaviruses in infants with acute respiratory disease and in adult hematopoietic stem cell transplant recipients. *Med. Virol.* **82**, 153–156 (2010)
14. Dropulic L.K., Jones R.J.: Polyomavirus BK infection in blood and marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* **41**, 11–18 (2008)
15. Elfaitouri A., Hammarin A.L., Blomberg J.: Quantitative real-time PCR assay for detection of human polyomavirus infection. *J. Virol. Methods*, **135**, 207–213 (2006)
16. Erard V., Storer B., Corey L., Nollkamper J., Huang M.L., Limaye A., Boeckh M.: BK virus infection in hematopoietic stem cell transplant recipients: frequency, risk factors, and association with postengraftment hemorrhagic cystitis. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 1861–1865 (2004)
17. Feng H., Shuda M., Chang Y., Moore P.S.: Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*, **319**, 1096–1100 (2008)
18. Focosi D., Maggi F., Andreoli E., Lanini L., Ceccherini-Nelli L., Petrini M.: The role of bone marrow cells for JCV pathogenicity. *J. Clin. Virol.* **45**, 230–231 (2009)
19. Frisque R.J., Bream G.L., Cannella M.T.: Human polyomavirus JC virus genome. *J. Virol.* **51**, 458–469 (1984)
20. Giraud G., Priftakis P., Bogdanovic G., Remberger M., Dubrulle M., Hau A., Gutmark R., Mattson J., Svahn B.M., Ringden O., Winiarski J., Ljungman P., Dalianis T.: BK-virus and haemorrhagic cystitis are more frequent in allogeneic haematopoietic stem cell transplant patients receiving full conditioning and unrelated-HLA-mismatched grafts. *Bone Marrow Transplant.* **41**, 737–742 (2008)
21. Harkensee C., Vasdev N., Gennery A.R., Willetts I.E., Taylor C.: Prevention and management of BK-virus associated haemorrhagic cystitis in children following haematopoietic stem cell transplantation: a systematic review and evidence-based guidance for clinical management. *Br. J. Haematol.* **142**, 717–731 (2008)

22. Jeffers L.K., Madden V., Webster-Cyriaque J.: BK virus has tropism for human salivary gland cells in vitro: implications for transmission. *Virology*, **394**, 183–193 (2009)
23. Jiang M., Abend J.R., Johnson S.F., Imperiale M.J.: The role of polyomaviruses in human disease. *Virology*, **384**, 266–273 (2009)
24. Johnson E.M.: Structural evaluation of new human polyomaviruses provides clues to pathobiology. *Trends Microbiol.* **18**, 215–223 (2010)
25. Khalili K., White M.K.: Human demyelinating disease and the polyomavirus JCV. *Mult. Scler.* **12**, 133–142 (2006)
26. Kmiecik D., Dębicki S.: Rola wirusa JC w patogenezie chorób nowotworowych i zaburzeń związanych z osłabieniem odporności. *Post. Mikrobiol.* **47**, 5–14 (2008)
27. Koukoulaki M., Grispou E., Pistolas D., Balaska K., Apostolou T., Anagnostopoulou M., Tseleni-Kotsovili A., Hadjiconstantinou V., Paniara O., Saroglou G., Legakis N., Drakopoulos S.: Prospective monitoring of BK virus replication in renal transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis.* **11**, 1–10 (2009)
28. Krumbholz A., Bininda-Emonds O.R., Wutzler P., Zell R.: Evolution of four BK virus subtypes. *Infect. Genet. Evol.* **8**, 632–643 (2008)
29. Lam W.Y., Leung B.W., Chu I.M., Chan A.C., Ng H.K., Chan P.K.: Survey for the presence of BK, JC, KI, WU and Merkel cell polyomaviruses in human brain tissues. *J. Clin. Virol.* **48**, 11–14 (2010)
30. Leung A.Y., Suen C.K., Lie A.K., Liang R.H., Yuen K.Y., Kwong Y.L.: Quantification of polyoma BK viruria in hemorrhagic cystitis complicating bone marrow transplantation. *Blood*, **98**, 1971–1978 (2001)
31. Leung A.Y., Mak R., Lie A.K., Yuen K.Y., Cheng V.C., Liang R., Kwong Y.L.: Clinicopathological features and risk factors of clinically overt haemorrhagic cystitis complicating bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **29**, 509–513 (2002)
32. Leung A.Y., Yuen K.Y., Kwong Y.L.: Polyoma BK virus and haemorrhagic cystitis in haematopoietic stem cell transplantation: a changing paradigm. *Bone Marrow Transplant.* **36**, 929–937 (2005)
33. Lundstig A., Dillner J.: Serological diagnosis of human polyomavirus infection. *Adv Exp. Med. Biol.* **577**, 96–101 (2006)
34. Matłoz B., Durlik M.: Śródmiąższowe zapalenie nerki przeszczepionej wywołane zakażeniem wirusem polyoma BK. *Przegl. Epidemiol.* **60**, 133–140 (2006)
35. McNees A.L., White Z.S., Zanwar P., Vilchez R.A., Butel J.S.: Specific and quantitative detection of human polyomaviruses BKV, JCV, and SV40 by real time PCR. *J. Clin. Virol.* **34**, 52–62 (2005)
36. Merlino C., Bergallo M., Giacchino F., Daniele R., Bollero C., Comune L., Segoloni G.P., Cavallo R.: Human polyomavirus BK monitoring by quantitative PCR in renal transplant recipients. *Intervirology*, **47**, 41–47 (2004)
37. Miyamura T., Jikuya H., Soeda E., Yoshiike K.: Genomic structure of human polyoma virus JC: nucleotide sequence of the region containing replication origin and small-T-antigen gene. *J. Virol.* **45**, 73–79 (1983)
38. Mourez T., Bergeron A., Ribaud P., Scieux C., de Latour R.P., Tazi A., Socié G., Simon F., LeGoff J.: Polyomaviruses KI and WU in immunocompromised patients with respiratory disease. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 107–109 (2009)
39. Mueller A., Simon A., Gillen J., Schildgen V., Tillmann R.L., Reiter K., Schildgen O.: Polyomaviruses KI and WU in children with respiratory tract infection. *Arch. Virol.* **154**, 1605–1608 (2009)
40. Neske F., Blessing K., Ullrich F., Pröttel A., Wolfgang Kreth H., Weissbrich B.: WU polyomavirus infection in children, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 680–681 (2008)
41. Neu U., Stehle T., Atwood W.J.: The Polyomaviridae: Contributions of virus structure to our understanding of virus receptors and infectious entry. *Virology*, **384**, 389–399 (2009)
42. Nguyen N.L., Le B.M., Wang D.: Serologic evidence of frequent human infection with WU and KI polyomaviruses. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 1199–1205 (2009)
43. Pang X.L., Doucette K., LeBlanc B., Cockfield S.M., Preiksaitis J.K.: Monitoring of polyomavirus BK virus viruria 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 (2007)
44. Payungporn S., Chieochansin T., Thongmee C., Panjaworayan N., Samransamruajkit R., Theamboonlers A., Poovorawan Y.: Detection and discrimination of WU/KI polyomaviruses by real-time PCR with melting curve analysis. *J. Virol. Methods*, **153**, 70–73 (2008)
45. Payungporn S., Chieochansin T., Thongmee C., Samransamruajkit R., Theamboonlers A., Poovorawan Y.: Prevalence and molecular characterization of WU/KI polyomaviruses isolated from pediatric patients with respiratory disease in Thailand. *Virus Res.* **135**, 230–236 (2008)
46. Ramqvist T., Dalianis T.: Immunotherapeutic polyoma and human papilloma virus-like particles. *Immunotherapy*, **1**, 303–312 (2009).
47. Randhawa P., Ho A., Shapiro R., Vats A., Swalsky P., Finkelstein S., Uhrmacher J., Weck K.: Correlates of quantitative measurement of BK polyomavirus (BKV) DNA with clinical course of BKV infection in renal transplant patients. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 1176–1180 (2004)
48. Randhawa P., Shapiro R., Vats A.: Quantitation of DNA of polyomaviruses BK and JC in human kidneys. *J. Infect. Dis.* **192**, 504–509 (2005)
49. Ren L., Gonzalez R., Xie Z., Zhang J., Liu C., Li J., Li Y., Wang Z., Kong X., Yao Y., Hu Y., Qian S., Geng R., Yang Y., Vernet G., Paranhos-Baccalà G., Jin Q., Shen K., Wang J.: WU and KI polyomavirus present in the respiratory tract of children, but not in immunocompetent adults. *J. Clin. Virol.* **43**, 330–333 (2008)
50. Savona M.R., Newton D., Frame D., Levine J.E., Mineishi S., Kaul D.R.: Low-dose cidofovir treatment of BK virus-associated hemorrhagic cystitis in recipients of hematopoietic stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant.* **39**, 783–787 (2007)
51. Sharp C.P., Norja P., Anthony I., Bell J.E., Simmonds P.: Reactivation and mutation of newly discovered WU, KI, and Merkel cell carcinoma polyomaviruses in immunosuppressed individuals. *J. Infect. Dis.* **199**, 398–404 (2009)
52. Smith T.F., Espy M.J., Mandrekar J., Jones M.E., Cockerill F.R., Patel R.: Quantitative real-time polymerase chain reaction for evaluating DNAemia due to cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and BK virus in solid-organ transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* **45**, 1056–1061 (2007)
53. Sung H., Choi B.H., Pyo Y.J., Kim M.N., Han D.J.: Quantitation of BK virus DNA for diagnosis of BK virus-associated nephropathy in renal transplant recipients. *J. Korean. Med. Sci.* **23**, 4–8 (2008)
54. Whiley D.M., Mackay I.M., Sloots T.P.: Detection and differentiation of human polyomaviruses JC and BK by LightCycler PCR. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 4357–4361 (2001)
55. Wu S.W., Chang H.R., Lian J.D.: The effect of low-dose cidofovir on the long-term outcome of polyomavirus-associated nephropathy in renal transplant recipients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **24**, 1034–1038 (2009)
56. zur Hausen H.: Novel human polyomaviruses: re-emergence of a well known virus family as possible human carcinogens. *Int. J. Cancer.* **123**, 247–150 (2008)