

# 肾移植后BK病毒感染患者实时荧光定量PCR检测★

解俊杰<sup>1</sup>, 钱叶勇<sup>2</sup>, 石炳毅<sup>2</sup>, 范宇<sup>2</sup>, 柏宏伟<sup>2</sup>, 常京元<sup>2</sup>, 韩永<sup>2</sup>, 王洪阳<sup>1</sup>

## BK virus infection detected by real-time fluorescent quantitative PCR method after renal transplantation

Xie Jun-jie<sup>1</sup>, Qian Ye-yong<sup>2</sup>, Shi Bing-yi<sup>2</sup>, Fan Yu<sup>2</sup>, Bai Hong-wei<sup>2</sup>, Chang Jing-yuan<sup>2</sup>, Han Yong<sup>2</sup>, Wang Hong-yang<sup>1</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** For the BK virus (BKV) and BK virus-associated nephropathy, there lack of standardized laboratory diagnostic procedures and non-invasive testing methods.

**OBJECTIVE:** To establish a real-time fluorescent quantitative PCR method for determining the BKV level of urine and peripheral in renal transplant recipient and to evaluate its clinical application.

**METHODS:** According to the BK virus genome, BKV-F, BKV-R and Taqman fluorescent probe BKV-P were designed by us. 5' extremity of Taqman fluorescent probe BKV-P was labeled with fluorophores. Except 5' extremity, other sites were marked quenching group; the results of PCR reaction were obtained after detecting the samples.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The positive PCR products were preformed with gene sequencing, the result confirmed by BLAST was the BK virus gene sequence; 56 samples were detected with this method, 20 cases of BKV in serum samples and 20 cases of BKV in urine samples were positive and had a good S-type amplification curve. Dynamic range tests showed that there was a good correlation among the  $10^3$ - $10^{10}$  copies/mL standard curves. Five urine samples from healthy individuals, five blood samples and six blood samples of common pathogens in clinical were negative, there was no S-type amplification curve. The real-time fluorescent quantitative PCR assay established in this study was qualitative and quantitative, and has the ability of sensitivity and specificity, low-cost and less false-positive. The general determining results can be obtained in 30 minutes and suitable for large-scale clinical application.

Xie JJ, Qian YY, Shi BY, Fan Y, Bai HW, Chang JY, Han Y, Wang HY. BK virus infection detected by real-time fluorescent quantitative PCR method after renal transplantation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(5): 797-800. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 对于BK病毒感染、BK病毒相关性肾病的认识缺乏规范的实验室诊断程序和标准化的无创性检验方法。

**目的:** 建立肾移植后患者尿液和外周血BK病毒感染负荷实时荧光定量PCR检测方法。

**方法:** 针对BK病毒基因组,自主设计特异性引物BKV-F和BKV-R, Taqman荧光探针BKV-P, Taqman荧光探针BKV-P的5'端标记有荧光基团,在除5'端外的任意一个位置上标记有淬灭基团;然后处理待测样本,进行PCR反应。

**结果与结论:** 将检测阳性的扩增产物进行基因测序,测序结果经BLAST比对后证实为BK病毒基因序列;利用上述方法对56份样本进行检测,其中,20份BK病毒血清样本及20份BK病毒尿液样本检测均为阳性,有S型扩增曲线。动态范围测定显示在 $10^3$ - $10^{10}$  copies/mL之间标准曲线具有良好的相关性。5份健康人尿液样本,5份血液样本及6份临床常见的其他病原体血液样本检测均为阴性,无S型扩增曲线。结果表明该方法可进行定性、定量检测,特异性好,反应快速,一般30 min即可得到反应结果,并且成本低、假阳性少。

**关键词:** 实时荧光定量PCR; BK病毒; 尿液; 外周血; 引物; 肾移植

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.05.009

解俊杰, 钱叶勇, 石炳毅, 范宇, 柏宏伟, 常京元, 韩永, 王洪阳. 肾移植后BK病毒感染患者实时荧光定量PCR检测[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(5): 797-800. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

BK病毒是人类多瘤病毒中的一种,在健康人群隐性感染很常见,没有任何临床症状<sup>[1]</sup>。约80%的正常人既往有BK病毒感染史,当患者免疫功能低下时BK病毒重新激活,可出现BK病毒尿症。据报道,约45%肾脏移植受者出现病毒激活,1%~10%的肾移植患者出现BK病毒相关性肾病(BKVN),其中60%~70%会导致移植肾丧失功能。患者血浆和移植肾活检组织中高浓度的BK病毒已被证明与BKVN相关,但可导致

BKVN的病毒载量临床阈值迄今尚未确定。有研究显示,当血浆BK病毒阳性,特别病毒载量大于 $1.0 \times 10^3$  copies/mL时,活检证实与BKVN的肾功能受损相关<sup>[2]</sup>。在中国,对于BK病毒感染、BK病毒相关性肾病及其导致的泌尿系统并发症的认识刚刚起步,尚无大规模系统的前瞻性研究其流行病规律及危险因素,具体实验室诊断程序缺乏规范和标准化,尤其是对BKVN的诊断仍缺乏特异性和敏感性均十分有效的无创性检验方法,而诊断的“金标准”仍需病理学活检,患者难以接受。综合以上,亟需一种新型的能够实现快速、有效且特异性好的检测

<sup>1</sup>Postgraduate Medical School, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China; <sup>2</sup>Department of Urology, the 309 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China

Xie Jun-jie★, Studying for master's degree, Postgraduate Medical School, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China xiaopx309@126.com

Correspondence to: Qian Ye-yong, Master, Chief physician, Department of Urology, the 309 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China qianyy@medmail.com.cn

Received: 2011-08-16 Accepted: 2011-12-15

<sup>1</sup>解放军总医院军医进修学院,北京市100853; <sup>2</sup>解放军第309医院泌尿外科,北京市100091

解俊杰★,男,1985年生,湖北省黄石市人,汉族,解放军总医院军医进修学院在读硕士,主要从事泌尿外科、肾移植和移植免疫学方面的研究。xiaopx309@126.com

通讯作者: 钱叶勇, 硕士, 主任医师, 解放军第309医院泌尿外科, 北京市100091 qianyy@medmail.com.cn

中图分类号: R617  
文献标识码: A  
文章编号: 1673-8225 (2012)05-00797-04

收稿日期: 2011-08-16  
修回日期: 2011-12-15 (20110816006/M·C)

BK病毒方法, 用于患者血、尿BK病毒PCR的定性、定量检测, 以便BKVAN的预测及治疗监测<sup>[3]</sup>。

## 1 对象和方法

**设计:** 体外观察实验。

**时间及地点:** 于2011-03/05在解放军第309医院器官移植中心移植研究室完成。

**对象:** 选择明确诊断的BK病毒感染者, 其中20份BK病毒血清样本和20份BK病毒尿液样本。另选取5份健康人尿液样本, 5份健康人血液样本, 1份乙肝病毒(HBV)血液样本, 1份丙肝病毒(HCV)血液样本, 1份EB病毒(EBV)血液样本, 1份人巨细胞病毒(HCMV)血液样本, 1份人类细小病毒B19(HPV B19)血液样本和1份JC病毒(JCV)血液样本, 共计56份样本, 利用自行设计的一套实时荧光PCR检测BK病毒。

**诊断标准:** ①20份BK病毒血清样本: 术后尿沉渣发现decoy细胞, 以及尿液和血液标本Real Time-PCR病毒拷贝数均达到阳性标准的标本。②20份BK病毒尿液样本: 术后尿沉渣发现decoy细胞, 尿液标本病毒拷贝数达到阳性标准而血液标本病毒拷贝数未达到阳性标准的标本。③10份健康人尿液样本和血液标本: 均选正常人群体检时的血液和尿液标本。④其余6份血液样本均选自患有相对疾病患者的血液标本, 同时也无任何其他相关疾病。

**纳入标准:** ①肾移植后BK病毒感染患者。②正常人群只感染BK一种病毒者。③健康体检者。④患有以下HBV、HCV、EBV、HCMV、HPV B19及JCV的同时排除BK感染者。⑤实验过程符合医院伦理学标准的要求<sup>[4]</sup>。

**排除标准:** ①感染包括BK病毒以及还有其他病毒者。②正常人群感染2种以上病毒者(包括BK病毒)。③肾移植后尿沉渣未发现过decoy细胞及尿液、血液标本病毒拷贝数未达到阳性标准者。④尿沉渣发现decoy细胞, 而尿液、血液标本病毒拷贝数未达到阳性标准者。

**方法:**

**样本类型及收集:**

**血清样本采集:** 用无菌注射器在受检者手臂弯曲处或手背处抽取静脉血3~5 mL, 注入无菌收集管, 室温放置不超过4 h, 待样本自行析出血清或直接室温1 600 r/min离心5 min分离出血清, 转移到1.5 mL灭菌离心管中备用。

**尿液样本采集:** 留取中段晨尿约20 mL(不超过容器体积的2/3)密封送检。

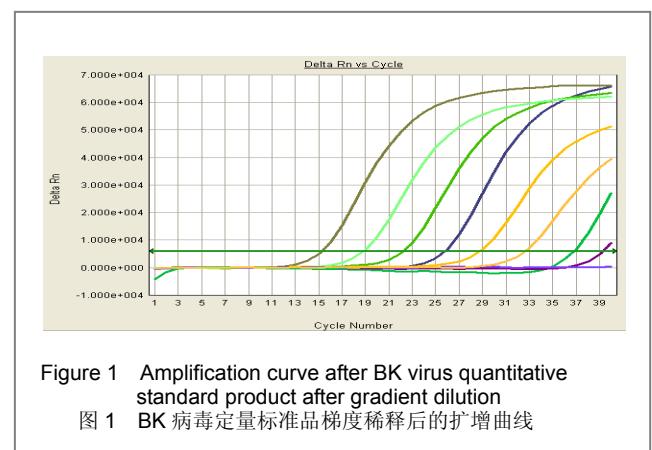
**标本保存与处理:** 样本应尽快检测, 4 °C保存不超过24 h, -20 °C条件下可以长期保存。另外肝素可能会抑制PCR反应, 本试剂盒不适用于含有肝素的样本检测<sup>[5]</sup>。

**BK病毒样本(尿液与血液)的处理与DNA提取:** 采用煮沸

裂解法处理样本与提取核酸。①血液样本: 取100 μL血清或血浆样本与50 μL浓缩液混匀, 13 000 r/min离心10 min后去除上清, 加入25 μL裂解液混匀沉淀, 100 °C煮沸10 min, 离心10 min, 上清即为纯化的病毒核酸<sup>[6]</sup>。②尿液样本: 取1 000 μL尿液样本, 13 000 r/min离心10 min后去除上清, 加入50 μL裂解液混匀沉淀, 100 °C煮沸10 min, 离心10 min, 上清即为纯化的病毒核酸。

**引物与探针的设计:** 针对BK病毒基因组设计特异性引物BKV-F和BKV-R, Taqman荧光探针BKV-P, Taqman荧光探针BKV-P的5'端标记有荧光基团——6-羧基荧光素(6-carboxyfluorescein, FAM), 在除5'端外的任意一个位置上标记有淬灭基团——选自黑洞淬灭剂1(Black Hole Quencher 1, BHQ1), 优选为3'端<sup>[7]</sup>; 其中, BKV-F的核苷酸序列如SEQ ID NO: 1所示, 或由SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列经取代、缺失、添加形成的核苷酸序列; NO: 1——AGA ACT GCT CCT CAA TGG ATG(序列方向5'-3', 以下同); BKV-R的核苷酸序列如SEQ ID NO: 2所示, 或由SEQ ID NO: 2所示的核苷酸序列经取代、缺失、添加形成的核苷酸序列; NO: 2——AGC TGC CCC TGG ACA CTC T; BKV-P的核苷酸序列如SEQ ID NO: 3所示, 或由SEQ ID NO: 3所示的核苷酸序列经取代、缺失、添加形成的核苷酸序列; NO: 3——TGC TCT TGAAGC ATA TGAAGA TGG CCC CA。

**外参照标准品的建立及质量评估:** PCR反应均设置阴性质控组和BK病毒定量标准品I~IV组, 其中阴性质控组的待测模板为纯水, BK病毒定量标准品I~IV的待测模板分别为BKV定量标准品I, II, III, IV。将扩增产物插入T载体构建重组质粒, 重组质粒转化细菌后扩增<sup>[8]</sup>。将提纯重组质粒后利用紫外分析法测定吸光度, 计算质粒浓度(copies/mL)。最后将重组质粒稀释成4个梯度(5×10<sup>5</sup>~5×10<sup>8</sup> copies/mL), 分别为试剂盒的BKV定量标准品I, II, III, IV; 将BKV定量标准品进行梯度稀释后进行检测, 如图1所示, 从左至右分别是2×10<sup>9</sup>, 2×10<sup>8</sup>, 2×10<sup>7</sup>, 2×10<sup>6</sup>, 2×10<sup>5</sup>, 2×10<sup>4</sup>, 2×10<sup>3</sup>, 2×10<sup>2</sup> copies/mL的扩增曲线。



### 实时荧光定量PCR检测BK病毒感染及其方法学评价:

实时荧光定量PCR试剂配制: 由鑫诺美迪公司提供的PCR反应体系包括<sup>[9]</sup>: PCR反应液19.8  $\mu\text{L}$ 、DNA聚合酶0.2  $\mu\text{L}$ 、待检模板5.0  $\mu\text{L}$ ; 其中, PCR反应液的组成为: 10 $\times$ 反应缓冲液2.5  $\mu\text{L}$ , BKV-F(10  $\mu\text{mol/L}$ )0.5  $\mu\text{L}$ , BKV-R(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ , BKV-P(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , dNTP 2.0  $\mu\text{L}$ , 最后用无菌超纯水将反应体系补至19.8  $\mu\text{L}$ 。PCR的反应条件为: 92~95 $^{\circ}\text{C}$ , 3~5 min; 92~95 $^{\circ}\text{C}$ , 10~15 s; 92~95 $^{\circ}\text{C}$ , 55~65 $^{\circ}\text{C}$ , 10~35 s, 40个循环; 优选为: 94 $^{\circ}\text{C}$ , 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ , 15s; 94 $^{\circ}\text{C}$ , 60 $^{\circ}\text{C}$ , 35 s, 40个循环。采用ABI7500荧光定量PCR仪, 荧光信号收集时设定为FAM荧光素, 荧光信号收集设在60 $^{\circ}\text{C}$ 。

质量控制及结果判断: 如果检测通道没有出现S型扩增曲线, 判为BK病毒阴性。如果检测通道出现S型扩增曲线, 利用BKV定量标准品检测所生成的标准曲线计算待测样本的浓度(copies/mL)。为减少污染, 荧光PCR全过程闭管操作, 杜绝污染及由此而导致的假阳性<sup>[10]</sup>。

主要观察指标: ①是否出现S型扩增曲线。②计算待测样本的浓度(copies/mL)。

## 2 结果

对实验标本进行PCR检测后, 其中20份BK病毒血清样本及20份BK病毒尿液样本检测均为阳性, 有S型扩增曲线。动态范围测定显示在 $10^3\sim 10^{10}$  copies/mL之间标准曲线具有良好的相关性。健康人尿液样本(5份), 血液样本(5份)及临床常见的其他病原体, 包括乙肝病毒(HBV), 丙肝病毒(HCV), EB病毒(EBV), 人巨细胞病毒(HCMV), 人类细小病毒B19(HPV B19)和JC病毒(JCV)检测均为阴性, 无S型扩增曲线。从而证实了本发明检测方法的特异性, 不和其他的病毒发生交叉反应, 例如乙肝病毒(HBV), 丙肝病毒(HCV), EB病毒(EBV), 人巨细胞病毒(HCMV), 人类细小病毒B19(HPV B19)和JC病毒(JCV)。

将检测阳性的扩增产物进行基因测序, 测序结果经BLAST比对后证实为BK病毒基因序列。本研究所应用的TaqMan探针, 对目标序列有很高的特异性, 而且设计相对简单, 定量准确, 操作简单、安全、自动化程度高而且可预防污染, 可以做到绝对定量。通过方法学评价可以看出, 本法具有很好的重复性、特异性、较高的灵敏度( $10^3$  copies/mL)和较宽的线性范围( $10^3\sim 10^{10}$  copies/mL)。

据国外文献经验, 巴氏染色法尿沉渣涂片可以观察细胞核内的包涵体形态<sup>[11]</sup>, 因此镜检decoy细胞采用巴氏染色的方法。对20份BK病毒尿液样本进行尿液沉渣镜检, 均可见明显decoy细胞形态, 见图2。提示患者体内存在BK病毒激活复制, 表示可以诊断BK病毒尿症,

同时也验证了本样品的来源准确性。

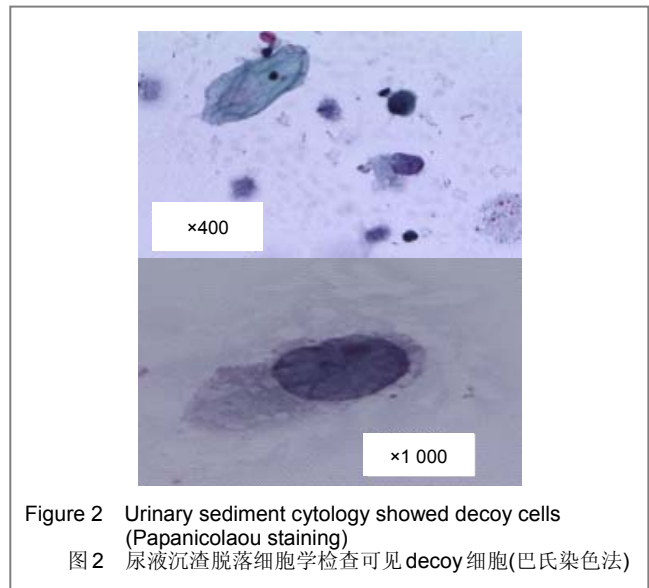


Figure 2 Urinary sediment cytology showed decoy cells (Papanicolaou staining)

图2 尿液沉渣脱落细胞学检查可见 decoy 细胞(巴氏染色法)

## 3 讨论

目前在中国, 临床上对BK病毒相关性肾病尚无特别有效方法, 一般主张采取早期诊断, 控制抗排斥药物的浓度(或者调整他克莫司为环孢素A等), 同时配合抗病毒药物(如西多福韦)的使用等<sup>[12]</sup>。BKVAN诊断的金标准是肾组织活检, 再加上BKVAN病灶的局限性导致准确取样困难, 灵敏度会受到影响。并且肾组织穿刺带有一定创伤性, 加上患者早期BK病毒感染比较隐蔽, 对肾功能影响较小, 行肾组织活检不易被患者接受; 同时肾组织活检还要排除急性排斥反应, 药物毒性和其他潜在疾病的影响<sup>[13]</sup>。患者BK病毒激活复制后尿液首先表现为病毒尿症, 可通过尿液decoy细胞镜检判断, 但这种方法受限于尿液病理差异及尿道结构的个体差异, 加上结果判定主观, 难以做到标准化。早期诊断、处理BK病毒感染可以使移植丢失的发生率明显降低。有国外研究认为, PCR定量检测外周血中BK病毒DNA含量对BKVAN诊断的阳性预测值可达75%, 是预测BKVAN的独立危险因素<sup>[14]</sup>。因此, BK病毒感染的早期诊断对肾移植患者预后具有重要的临床意义, 尽早进行对症治疗。

实时荧光定量PCR检测方法建立的关键是外标准品的制备<sup>[15]</sup>。外参照标准品通常由以下几种方式获得: ①直接化学合成单链目的基因片段, 它的优点是纯度高、定量准确, 但受化学合成工艺的限制。②利用设计的引物从可疑感染标本获得扩增片段并基因测序验证, 它的优点是方法简单, 对于本实验而言, 需要设计合适引物从大量标本DNA抽提物中扩增所需要的野生型靶基因片段, 再将扩增的PCR产物进行测序确认, 工作量较大, 而且结果确认困难<sup>[16]</sup>。③从纯化病毒株扩增片段,

克隆入载体, 制备质粒作为标准品, 此方法获得的标准品质粒特异性好, 纯度较高, 性质稳定, 而且由于其相对分子质量一般较大, 不易造成污染出现假阳性; 同时, 质粒后期的大量制备方便, 价廉。但目前国内尚无纯化的BK病毒株保存<sup>[17]</sup>, 直接应用第3种方法获得外标准品有困难, 因此将第1种和第2种方法结合起来, 构建的质粒作为实验标准品具有稳定性、重复性好, 扩增效率高, 获得较为满意的效果<sup>[18]</sup>。另外, 本研究所应用的TaqMan探针, 对目标序列有很高的特异性, 而且设计相对简单, 定量准确, 无需内参照, 方法操作简单、安全、自动化程度高而且可预防污染, 可以做到绝对定量<sup>[19]</sup>。通过方法学评价可以看出, 本法具有很好的重复性、特异性、较高的灵敏度( $10^3$  copies/mL)和较宽的线性范围( $10^3 \sim 10^{10}$  copies/mL)。

本检测方法可以快速、简便的对BK病毒相关性肾病进行筛查, 一般30 min即可得到反应结果, 并且成本低、假阳性少, 改变了现有技术中需要进行组织活检的现状<sup>[20]</sup>。另外按照本方法设计的用于检测BK病毒的试剂盒, 经过验证具有敏感性高、特异性好、反应快速、假阳性少且成本低的优势, 已经申请专利, 适合于大规模临床开展, 因而能保证及时的病例诊治及治疗效果监测。

#### 4 参考文献

- [1] Sung H, Choi BH, Pyo YJ, et al. Quantitation of BK Virus DNA for Diagnosis of BK Virus-Associated Nephropathy in Renal Transplant Recipients. *J Korean Med Sci.* 2008; 23(5): 814-818.
- [2] Lu M, Zhu YH, Wang H, et al. Dier Junyi Daxue Xuebao. 2006; 27(6):672-675.  
陆明, 朱有华, 王皓, 等. 实时荧光定量PCR检测肾移植患者术后BK病毒感染[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(6):672-675.
- [3] Prince O, Savic S, Dickenmann M, et al. Risk factors for polyoma virus nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2009; 24(3):1024-1033.
- [4] 国务院办公厅. 中华人民共和国国务院令(第491号)《人体器官移植条例》[EB/OL]. (2007-04-06). [http://www.gov.cn/jwqk/2007-04/06/content\\_574120.htm](http://www.gov.cn/jwqk/2007-04/06/content_574120.htm).
- [5] Seemayer CA, Seemayer NH, Durmuller U, et al. BK virus large T and VP-1 expression in infected human renal allografts. *Nephrol Dial Transplant.* 2008; 23(12): 3752-3761.
- [6] Viscount HB, Eid AJ, Espy MJ, et al. Polyomavirus polymerase chain reaction as a surrogate marker of polyomavirus-associated nephropathy. *Transplantation.* 2007; 84(3):340-345.
- [7] Singh D, Kiberd B, Gupta R, et al. Polyoma virus-induced hemorrhagic cystitis in renal transplantation patient with polyoma virus nephropathy. *Urology.* 2006; 67(2):423.e11-423.e12.
- [8] Hoffman NG, Cook L, Atienza EE, et al. Marked Variability of BK Virus Load Measurement Using Quantitative Real-Time PCR among Commonly Used Assays. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(8): 2671-2680.
- [9] Dadhania D, Snopkowski C, Ding R, et al. Epidemiology of BK virus in renal allograft recipients: independent risk factors for BK virus replication. *Transplantation.* 2008; 86(4):521-528.
- [10] Babel N, Fendt J, Karaivanov S, et al. Sustained BK viraemia as an early marker for the development of BKV-associated nephropathy: analysis of 4128 urine and serum samples. *Transplantation.* 2009; 88(1):89-95.
- [11] Costa C, Bergallo M, Astegiano S, et al. Monitoring of BK virus replication in the first year following renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2008; 23(10):3333-3336.
- [12] Shah KV. Human polyomavirus BKV and renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15(6):754-755.
- [13] Purighalla R, Shapiro R, McCauley J, et al. BK virus infection in a kidney allograft diagnosed by needle biopsy. *Am J Kidney Dis.* 1995; 26(4):671-673.
- [14] Hirsch HH. BK virus: opportunity makes a pathogen. *Clin Infect Dis.* 2005; 41(3):354-360.
- [15] Ramos E, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, et al. Clinical course of polyoma virus nephropathy in 67 renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13(8):2145-2151.
- [16] Hariharan S. BK virus nephritis after renal transplantation. *Kidney Int.* 2006; 69(4):655-662.
- [17] Colla L, Mesiano P, Morellini V, et al. Human polyomavirus BK in patients with lupus nephritis: clinical and histological correlations. *Lupus.* 2007; 16(11):881-886.
- [18] Nickeleit V, Singh HK, Mihatsch MJ. Polyomavirus nephropathy: morphology, pathophysiology, and clinical management. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2003; 12(6):599-605.
- [19] Prosser SE, Orentas RJ, Jurgens L, et al. Recovery of BK virus large T-antigen-specific cellular immune response correlates with resolution of bk virus nephritis. *Transplantation.* 2008; 85(2): 185-192.
- [20] Rubio L, Pinczewski J, Drachenberg CB, et al. A multiplex real-time PCR method for quantification of BK and JC polyomaviruses in renal transplant patients. *Diagn Mol Pathol.* 2010; 19(2):105-111.

#### 来自本文课题的更多信息--

**作者贡献:** 实验设计为石炳毅, 实验实施为解俊杰, 实验评估为钱叶勇、常京元和柏宏伟, 资料收集为解俊杰和王洪阳。解俊杰成文, 范宇和韩永审校, 钱叶勇对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理批准:** 患者在手术前均签署知情同意书, 实验收集的血液和尿液标本均获得完全知情同意后实施, 实验过程符合医院伦理学标准要求。

**本文创新性:** ①针对 BK 病毒基因组设计自行特异性引物 BKV-F 和 BKV-R, Taqman 荧光探针 BKV-P。②国内对 BK 病毒的研究才刚刚起步, 没有成熟的 BK 病毒检测试剂盒; 本文研究的是检测 BK 病毒一种方法, 已经做成了试剂盒, 并且申请专利。试剂盒包括: PCR 反应液、DNA 聚合酶、待检模板、阴性质控组和 BK 病毒定量标准品 I ~ IV 组; PCR 反应液中含有 BKV-F、BKV-R 和 BKV-P。③这种实时荧光定量 PCR 检测方法, 具有敏感性高、特异性好、反应快速、假阳性少且成本低的优势; 可以实现对 BK 病毒的快速、有效且准确的定量检测, 保证及时进行 BK 病毒载量的检测, BK 病毒相关性肾病的预测及治疗监测。