RENATO DOS REIS OLIVEIRA

**Determinação da incidência e caracterização molecular do
poliomavírus humano BK em pacientes submetidos a
transplante renal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Sérgio Pannuti

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Renato dos Reis

Determinação da incidência e caracterização molecular do poliomavírus humano BK em pacientes submetidos a transplante renal / Renato dos Reis Oliveira. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Cláudio Sérgio Pannuti.

Descritores: 1.Polyomavirus 2.Reação em cadeia da polimerase 3.Transplante de rim 4.Incidência 5.Biologia molecular 6.Filogenia

USP/FM/DBD-419/12

Este estudo contou com o apoio financeiro da FAPESP, através da atribuição de bolsa regular de doutorado (Processo nº 2010/01710-3)

AGRADECIMENTOS

Meu orientador, Professor Doutor Cláudio Pannuti, pelos ensinamentos e dedicação

Dr. Elias Neto, Dra. Lígia Pierrot, Camila Bicalho e funcionários da UTR do HC-FMUSP, pela parceria no projeto

Dra. Maria Cristina Fink, pelo incentivo e apoio ao estudo

Dra. Camila Malta Romano, pelo importante auxílio nas análises moleculares

Dr. Expedito Luna, pelo auxílio na análise estatística

Gislene Bezerra, Ariane Falconi, Letícia Lima, Giselle Santos e Sandra Barssotti, pela imprescindível contribuição ao projeto

Luis Nali, Paulo Urbano e Laura Sumita pelo auxílio na otimização das técnicas

Todos os funcionários e pós-graduandos do Laboratório de Virologia

Coordenadores e funcionários da Pós-graduação do Departamento de Moléstias Infeciosas e Parasitárias da FMUSP

Aos meus pais Vítor e Maria Emília, minha família e colegas de trabalho

À minha esposa, Fernanda Komatsu, pelo apoio incondicional

À FAPESP, pelo apoio financeiro

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1. O poliomavírus BK.....	2
1.2. Distribuição geográfica do BKV.....	5
1.3. Transmissão do poliomavírus BK.....	8
1.4. O poliomavírus BK em transplante renal.....	10
1.5. Fatores de risco associados ao BKV.....	14
1.6. Diagnóstico laboratorial dos poliomavírus.....	19
1.7. Estudos no Brasil envolvendo o BKV.....	22
 2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	 24
 3. OBJETIVOS DO ESTUDO	 27
3.1. Objetivo principal.....	28
3.2. Objetivos secundários.....	28
 4. CASUÍSTICA E METODOLOGIA	 30
4.1. Desenho do estudo.....	31
4.2. Critérios de inclusão e exclusão.....	32
4.3. Aspectos éticos.....	32
4.4. Monitoramento das amostras.....	33
4.5. Coleta e processamento das amostras.....	35
4.6. Otimização da reação em cadeia por polimerase quantitativa para detecção do gene do antígeno T do BKV.....	37
4.6.1. Determinação do número de ciclos e da concentração de oligonucleotídeos.....	37
4.6.2. Clonagem de segmentos específicos do BKV.....	38
4.6.3. Quantificação da carga viral do BKV em amostras clínicas	39
4.6.4. Determinação da sensibilidade analítica da qPCR.....	39
4.6.5. Determinação da especificidade da qPCR.....	40
4.7. Correlação entre as técnicas de qPCR e citologia para detecção do BKV na urina de receptores	40
4.8. Determinação da incidência do BKV em receptores de transplante renal.....	41
4.9. Avaliação da dinâmica de excreção urinária e plasmática do BKV EM receptores de transplante renal.....	42
4.10. Genotipagem do BKV em amostras de doadores e receptores de transplante renal.....	43
4.11. Identificação e comparação de rearranjos moleculares no gene VP1 do BKV em amostras de urina de doadores e receptores de transplante renal.....	43

4.12. Identificação e comparação de rearranjos moleculares no gene NCCR do BKV em amostras de urina e plasma de receptores de transplante renal.....	45
4.13. Análise molecular dos produtos de PCR.....	46
4.13.1. Purificação das amostras positivas.....	46
4.13.2. Sequenciamento das amostras positivas.....	47
4.13.3. Classificação genotípica e análise filogenética.....	48
4.14. Análise estatística.....	49
5. RESULTADOS	50
5.1. Otimização da reação em cadeia por polimerase quantitativa (qPCR) para detecção do gene do antígeno T do BKV	51
5.1.1. Determinação do número de ciclos e da concentração de oligonucleotídeos.....	51
5.1.2. Quantificação da carga viral do BKV em amostras clínicas..	51
5.1.3. Determinação da sensibilidade analítica da qPCR.....	53
5.1.4. Determinação da especificidade da qPCR.....	55
5.2. Correlação entre as técnicas de qPCR e citologia para detecção do BKV na urina de receptores.....	55
5.3. Determinação da incidência do BKV em receptores de transplante renal	58
5.4. Avaliação da dinâmica de excreção urinária e plasmática do BKV EM receptores de transplante renal.....	59
5.4.1. Receptores e doadores incluídos na coorte.....	59
5.4.2. Características demográficas e presença do BKV em urina de receptores e doadores.....	60
5.4.3. Proporção de pacientes com virúria e viremia por BKV nos diferentes meses do período pós-transplante.....	62
5.4.4. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier.....	66
5.4.5. Desempenho da qPCR e da citologia na detecção de amostras com viremia.....	70
5.4.6. Cálculo da sensibilidade, especificidade e valor preditivo para determinação de viremia.....	72
5.4.7. Relação entre episódio de virúria por BKV e evolução para viremia	74
5.4.8. Avaliação do impacto da excreção do BKV pelos receptores no período pré-transplante.....	76
5.4.9. Avaliação do impacto da virúria do doador na excreção do BKV pelos receptores.....	78
5.5. Caracterização molecular do poliovírus BK.....	80

5.5.1. Determinação dos subtipos do BKV em amostras de doadores e receptores de transplante renal.....	80
5.5.2. Identificação e comparação de rearranjos moleculares no gene VP1 do BKV em amostras de urina de doadores e receptores de transplante renal.....	82
5.5.3. Identificação e comparação de rearranjos moleculares no gene NCCR do BKV em amostras de urina de doadores e receptores de transplante renal.....	84
6. DISCUSSÃO	87
7. CONCLUSÕES	104
8. REFERÊNCIAS	107
9. ANEXOS	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do genoma do poliomavírus BK (cepa de referência Dunlop).

Figura 2: Fluxograma mostrando as etapas do monitoramento das amostras de urina e de plasma para detecção do poliomavírus BK.

Figura 3: Amplificação de curvas-padrão por técnica de reação em cadeia por polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).

Figura 4: Reta de regressão linear das curvas-padrão do vírus BKV.

Figura 5: Evolução da virúria e da viremia por BKV nos receptores ao longo dos 12 meses de seguimento laboratorial, analisadas pela técnica de qPCR.

Figura 6: Árvore filogenética contendo sequências do gene da VP1 do BKV de amostras de urina de receptores e doadores da coorte e dos pares “doador-receptor”.

Figura 7: Alinhamento múltiplo das sequências genéticas da região da NCCR do BKV das amostras do receptor com rearranjo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Denominação, sequência de nucleotídeos e respectivas posições dos primers utilizados para genotipagem e análise molecular da região do gene da VP1 do BKV.

Tabela 2: Denominação e sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados para análise molecular da região do gene NCCR do BKV.

Tabela 3: Determinação do *cut-off* da reação de qPCR para BKV através de diluições seriadas do plasmídeo, testadas em decaplicatas (curvas 1 a 10).

Tabela 4: Desvios-padrão referentes à decaplicata de três diluições do plasmídeo de BKV.

Tabela 5: tabela de dupla entrada comparando os resultados do diagnóstico do BKV em amostras pareadas de urina entre duas técnicas - citologia e qPCR – considerando-se apenas as amostras conclusivas por decoy-cell.

Tabela 6: tabela de dupla entrada comparando os resultados do diagnóstico do BKV em amostras pareadas de urina entre duas técnicas - citologia e qPCR – considerando-se tanto amostras conclusivas como inconclusivas por decoy-cell.

Tabela 7: Valores do índice Kappa e as respectivas interpretações de concordância.

Tabela 8: Causas de abandono entre os receptores excluídos da coorte.

Tabela 9: Características demográficas dos 85 receptores incluídos na coorte.

Tabela 10: Características demográficas dos 23 doadores incluídos na coorte.

Tabela 11: Seguimento laboratorial mensal mostrando o número de receptores com amostras de urina e de plasma positivas para a presença do BKV por qPCR.

Tabela 12: Desempenho entre qPCR e citologia na detecção de viremia, comparando-se o número de urinas positivas por cada técnica.

Tabela 13: Comparação dos resultados da detecção do BKV por qPCR em amostras pareadas de urina e plasma para cálculo dos valores preditivo positivo e negativo para detecção de viremia.

Tabela 14: Comparação dos resultados da detecção do BKV por citologia em amostras pareadas de urina e plasma para cálculo dos valores preditivo positivo e negativo para detecção de viremia. Amostras de urina com resultados conclusivos.

Tabela 15: Comparação dos resultados da detecção do BKV por citologia em amostras pareadas de urina e plasma para cálculo dos valores preditivo positivo e negativo para detecção de viremia. Amostras de urina com resultados conclusivos e inconclusivos.

Tabela 16: Comparação do número de virurias positivas anteriores a viremia em receptores viremicos e respectivas medianas das cargas virais urinárias e plasmáticas por BKV.

Tabela 17: Tabela de dupla entrada comparando a excreção do BKV em urina (viruria) no período pré-transplante ao desenvolvimento de viruria no período pós-transplante.

Tabela 18: Tabela de dupla entrada comparando a excreção do BKV em urina (viruria) no período pré-transplante ao desenvolvimento de viremia no período pós-transplante.

Tabela 19: Tabela de dupla entrada comparando a evolução para viruria dos receptores no período pós-transplante que receberam rim de doadores excretors ou não-excretors de BKV.

Tabela 20: Tabela de dupla entrada comparando a evolução para viremia dos receptores no período pós-transplante que receberam rim de doadores excretors ou não-excretors de BKV.

Tabela 21: Identificação, posições e substituições de nucleotídeos e aminoácidos entre a sequência de doadores e receptores dos pares D3/R3 e D2/R2.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Gráfico de linhas mostrando a positividade por BKV em amostras de urina (viruria) e de plasma (viremia) dos receptores analisadas por qPCR, ao longo de 12 meses de seguimento.

Gráfico 2: Curva de Kaplan-Meier demonstrando a sobrevivência acumulada ou probabilidade (1-0) de um receptor não desenvolver viruria ao longo do seguimento.

Gráfico 3: Curva de Kaplan-Meier demonstrando a sobrevivência acumulada ou probabilidade (1-0) de um receptor não desenvolver viremia ao longo do seguimento.

Gráfico 4: Curva de Kaplan-Meier demonstrando a sobrevivência acumulada ou probabilidade (1-0) de todos os receptores não desenvolverem viruria ao longo do seguimento.

Gráfico 5: Curva de Kaplan-Meier demonstrando a sobrevivência acumulada ou probabilidade (1-0) dos receptores virúricos não desenvolverem viremia ao longo do seguimento.

LISTA DE ABREVIATURAS

BKV - poliomavírus humano BK

BKVN - nefropatia associada ao poliomavírus BK

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

DNA - ácido desoxirribonucleico

dNTPs – nucleotídeos

HC-FMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HLA - antígenos leucocitários humanos

JCV - poliomavírus humano JC

MMF - micofenolato mofetil

NCCR - região regulatória não-codificante do gene do BKV

PCR – reação em cadeia por polimerase

qPCR - reação em cadeia por polimerase quantitativa

TCLE - termo de consentimento livre e esclarecido

UTR - Unidade de transplante renal

VP1 – proteínas do capsídeo do BKV

RESUMO

Atualmente é reconhecida a importância clínica dos poliomavírus, especialmente a morbidade relacionada à infecção por BKV em pacientes submetidos a transplante renal. Apesar de já bem estabelecidas no exterior, existem em nosso meio poucas informações disponíveis sobre a incidência do poliomavírus BK nestes pacientes. O principal objetivo deste estudo foi o de determinar a incidência do poliomavírus BK em amostras sequenciais de urina e plasma de pacientes submetidos a transplante renal da Unidade de Transplante Renal do HC-FMUSP. Outros objetivos foram a genotipagem dos vírus circulantes, o sequenciamento da região VP1 do vírus para avaliar se a origem da infecção no receptor é oriunda do doador e ainda a investigação se rearranjos na região NCCR do BKV estariam associados a evolução para viremia. Os resultados mostraram que a densidade de incidência do BKV em receptores de transplante renal é de 8,1 casos de virúria por 100 receptores/mês e, entre os receptores virúricos, a densidade de incidência de viremia foi de 3,5 casos observados por cada 100 receptores/mês. A distribuição dos genótipos do BKV entre os receptores mostrou predomínio do genótipo I, em sua maioria pertencentes ao subgrupo Ia. Foram identificados os genótipos III e IV, considerados raros no exterior. A origem da infecção pelo BKV parece não ser exclusiva do doador, podendo estar relacionada à reativação de vírus do próprio receptor. Houve predomínio das formas arquetípicas de NCCR do BKV no sangue, sugerindo que formas rearranjadas do vírus não são uma condição para evolução para viremia. Outros estudos que incluam a análise sorológica, imunossupressão e dados clínicos devem ser elaborados para sustentar tais resultados.

1-Polyomavirus, 2-Reação em cadeia da polimerase, 3-Transplante de rim, 4-Incidência, 5-Biologia molecular, 6-Filogenia

SUMMARY

Currently, the clinical importance of polyomaviruses, especially the morbidity related to BKV infection in renal transplant patients, is well recognized. Although established abroad, in Brazil there is a lack of information available about the incidence of polyomavirus BK in these patients. The main objective of this study was to determine the incidence of BK polyomavirus in sequential samples of urine and plasma of patients undergoing renal transplantation at the Renal Transplant Unit of HCFMUSP. Other objectives were genotyping of circulating viruses, sequencing of VP1 region of the virus to assess the source of BKV infection from the donor and determine if BKV NCCR gene rearrangements would be associated with progression to viremia. The results showed that the incidence of BKV viruria in kidney transplant recipients was 8.1 cases per 100 receptors/month and, within the positive viruria receptors, the incidence of viremia was 3.5 cases per 100 receptors/month. The distribution of genotypes of BKV among recipients showed a predominance of genotype I, mostly belonging to subgroup Ia. Genotypes III and IV, which are considered rare abroad, were identified. The origin of BKV infection seems not to be exclusively from donor, and may be related to reactivation of BKV from the receptor. There was a predominance of archetypal forms of the NCCR BKV in the blood, suggesting that rearranged forms of the virus are not a mandatory condition for progress to viremia. Other studies including a serological analysis, immunosuppressant schedules and clinical data should be undertaken to sustain such results.

1-Polyomavirus, 2-Polimerase chain reaction, 3-Renal transplantation, 4-Incidence, 5-Molecular biology, 6-Phylogeny

1) REVISÃO DA LITERATURA

1.1. O POLIOMAVÍRUS BK

A família *Polyomaviridae* é formada por vírus que infectam o homem e diferentes espécies de animais, entre as quais macacos, bovinos, coelhos, e camundongos. Os poliomavírus humanos BK (BKV) e JC (JCV) partilham como características comuns a presença de ácido desoxirribonucleico (DNA) como material genético, o formato icosaédrico da cápsula viral e a ausência de envelope. Seus genomas apresentam 72% de homologia entre si e 70% de homologia em relação ao poliomavírus SV40 (Khalili *et al*, 2001). As diferenças genéticas existentes entre os poliomavírus estão provavelmente associadas à capacidade de infectarem diferentes hospedeiros, entre os quais o homem.

O BKV foi primeiramente isolado em 1971 a partir de um receptor de transplante de rim de origem sudanesa (Gardner *et al*, 1971). As letras B e K correspondem as iniciais do nome do paciente.

O vírus BKV desenvolve uma infecção subclínica persistente nos rins de indivíduos saudáveis, porém, em indivíduos imunocomprometidos, especialmente os submetidos a transplante renal, a reativação do vírus pode implicar em quadros clínicos graves, tal como a nefropatia associada ao BKV - BKN (Hirsch *et al*, 2003A).

Em 1965, um ano após a descrição do primeiro caso de uma doença desmielinizante grave, denominada leucoencefalopatia multifocal progressiva ou LEMP, a presença de partículas virais nas células da glia em

biópsias confirmou as especulações sobre a etiologia desta doença (Zu *et al*, 1965). Os experimentos posteriores identificaram um poliomavírus não descrito anteriormente como o agente infeccioso da LEMP. Os autores conseguiram demonstrar a atividade biológica viral em amostras retiradas de um paciente com as iniciais JC, sendo o novo vírus denominado JCV (Padget *et al*, 1971).

No início da década de 60, mais um membro da família *Polyomaviridae*, o SV40 - *Simian Virus 40* - foi identificado em culturas de células renais de macaco Rhesus. Acredita-se que vacinas contra a poliomielite, produzidas em células de rim de macaco previamente contaminadas pelo SV40, foram administradas acidentalmente, introduzindo este vírus na espécie humana (Carbone *et al*, 1997).

Apesar do SV40 possuir atividade oncogênica quando administrado em cobaias, a dinâmica de infecção e patologia deste vírus na espécie humana ainda não estão totalmente esclarecidas.

Recentemente, outros poliomavírus vêm sendo identificados e descritos na literatura.

Allander *et al* (2007) detectaram, em aspirados de nasofaringe, um material genético que apresentava baixa identidade com a região VP1 do SV40. Após clonagem do seu genoma, sua sequência demonstrou elevado grau de identidade com as proteínas não estruturais dos outros poliomavírus de primatas. Posteriormente, este DNA foi detectado em 6/637 (1%) aspirados de nasofaringe de pacientes sintomáticos. Este novo poliomavírus foi denominado KI (iniciais de Karolinska Institute).

No mesmo ano, Gaynor *et al* (2007), detectaram a presença de DNA que mostrava, respectivamente, 35%, 50% e 34% de identidade com os poliomavírus JC, BK e SV-40. Este novo poliomavírus, denominado WU (iniciais de Washington University), foi detectado em 2% dos aspirados de nasofaringe de pacientes com sintomas agudos de infecção do trato respiratório.

Feng *et al* (2008), ao estudarem células de carcinoma de Merkel, um tipo raro e agressivo de câncer de pele, descreveram um novo poliomavírus humano denominado poliomavírus MC, presente em tecidos controle de diferentes partes do corpo, utilizados na pesquisa para investigação de tumores.

Schowalter *et al* (2010), isolando DNA circulares de “swabs” de pele de indivíduos saudáveis através da técnica de RCA - “Rolling circle amplification” – identificaram dois novos poliomavírus, denominados HPyV6 e HPyV7. Análises sorológicas demonstraram que estes vírus, apesar de muito prevalentes, não são patológicos para o ser humano.

O genoma viral do poliomavírus linfotrópico (LPV) foi identificado recentemente no sangue periférico de pacientes HIV-positivos apresentando leucoencefalopatia, manifestação normalmente associada ao JCV. Estudo elaborado por Delbue *et al* (2010) demonstrou que a prevalência do LPV no sangue periférico de pacientes HIV positivos e adultos saudáveis é, respectivamente, de 7,2% e 4,7%. Não houve detecção do genoma do LPV em amostra de líquido cefalorraquidiano.

No mesmo ano, van der Meijden *et al* (2010) identificaram em um paciente de 15 anos o poliomavírus TSPyV, ou poliomavírus associado à tricodisplasia espinulosa, uma doença de pele rara encontrada em pacientes imunocomprometidos. Posteriores estudos de microscopia eletrônica confirmaram a presença do TSPyV em biópsias de pele de pacientes com tricodisplasia espinulosa, sugerindo um papel etiológico do vírus para esta doença (Chen et al., 2011).

Por fim, Scuda *et al* (2011), sequenciaram o genoma de um novo poliomavírus conhecido como HPyV9, que apresentou elevada identidade com o poliomavírus LPV. Análises moleculares posteriores, realizadas através da técnica de “nested-PCR”, confirmaram que este novo poliomavírus infecta pacientes sujeitos à elevada imunossupressão.

1.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO BKV

O genoma do poliomavírus BK (figura 1), de aproximadamente 5 kb, é constituído por uma região não-codificante ou regulatória denominada NCCR (*Non-Coding Control Region*) e por duas regiões codificantes – uma determinante dos antígenos tumorais precoces (antígeno T) e outra que codifica as proteínas tardias do capsídeo (VP1, VP2 e VP3) e a agnoproteína.

Figura 1: Esquema do genoma do poliomavírus BK (cepa de referência Dunlop). Adaptado de Ahsan N, “Polyomaviruses and Human Diseases” (ISBN: 0-387-29233-0)

A capacidade de replicação do BKV tem sido relacionada à alterações na estrutura genômica das NCCRs (Moens *et al*, 1995). Como esta região é altamente variável, particularmente entre os poliomavirus BK e JC, rearranjos da estrutura arquetípica tem sido identificados nos mais variados tecidos, entre os quais cérebro, rim e sangue, sugerindo que tais alterações moleculares podem estar associadas à capacidade do vírus infectar diferentes órgãos (Major *et al*, 2000).

A VP1, maior das proteínas do capsídeo, é responsável pela adesão do vírus aos receptores da célula hospedeira. Logo, esta proteína desempenha um importante papel na hemaglutinação das hemácias, sendo altamente imunogênica. Técnicas de inibição da hemaglutinação identificaram quatro diferentes sorotipos do BKV (Jin *et al*, 1993). Posteriormente, a análise molecular do gene da VP1 revelou uma

considerável heterogeneidade genética, o que levou ao reconhecimento de quatro diferentes subtipos virais: I, II, III e IV (Randhawa *et al*, 2002B).

A distribuição dos subtipos de BKV entre a população humana parece apresentar um forte componente geográfico (Zheng *et al*, 2007). O subtipo I está amplamente distribuído por todos os continentes mundiais, o subtipo IV parece estar geograficamente localizado na Ásia enquanto que os subtipos II e III são raros (Nishimoto *et al*, 2007; Zheng *et al*, 2007).

Tendo-se em conta resultados de análises filogenéticas, o subtipo I do BKV pode ainda ser subdividido em quatro subgrupos (I/a, I/b-1, I/b-2 e I/c) que apresentam um padrão de distribuição geográfico bem definido: “a” é mais prevalente na África, b-1 no sudoeste da Ásia, b-2 na Europa e “c” no noroeste da Ásia (Takasaka *et al*, 2004; Ikegaya *et al*, 2006; Zheng *et al*, 2007). Neste contexto, análises filogenéticas detalhadas do subtipo IV identificaram seis subgrupos (IV/a-1, IV/a-2, IV/b-1, IV/b-2, IV/c-1 e IV/c-2), sendo que todos os subgrupos exceto o IV/c-2 distribuem-se pelo leste da Ásia enquanto que o último distribui-se pelo noroeste da Ásia e Europa (Nishimoto *et al*, 2007).

A co-migração do BKV com a espécie humana sugere que, tal como o vírus JC (Agostini *et al*, 2001; Sugimoto *et al*, 2002), o BKV possa ser usado com um marcador de migrações populacionais na genética antropológica. Assumindo dois pontos internos de marcação – o desenvolvimento do homem moderno e a migração a partir da África – Krumbholz *et al* (2008), a partir de análises filogenéticas de genomas completos do BKV, estimaram que o início da distribuição da grande maioria dos subgrupos do vírus

coincidem com a distribuição geográfica do homem, a cerca de 50.000 anos atrás.

Não existem estudos, até a data, que demonstrem correlação entre os subtipos do vírus e as características clínicas do paciente (Hoffman *et al*, 2008).

Apenas um estudo investigou a distribuição dos diferentes genótipos BKV na população sul-americana. Zalona *et al* (2011) sequenciaram a região da VP1 do BKV em amostras de urina de 51 indivíduos submetidos a transplante renal, em hospitais do Rio de Janeiro. Os subgrupos Ib1 e Ia do subtipo I representaram, respectivamente, 67% e 29% dos vírus excretados nesta população. Apenas 4% das amostras apresentavam vírus do subtipo II, enquanto que não foram identificados os subtipos III e IV.

1.3. TRANSMISSÃO DO POLIOMAVÍRUS BK

O modo de transmissão dos poliomavirus na população em geral é ainda pouco entendido, porém múltiplas rotas de infecção estão provavelmente envolvidas (Randhawa *et al*, 2002A).

Estudos sorológicos indicam que a infecção primária por BKV ocorre normalmente durante a infância, em média entre o quarto e quinto ano de vida (Shah *et al*, 1973; Knowles *et al*, 2001). A soroprevalência é relativamente baixa até o sexto mês após o nascimento e aumenta cerca de 80% entre adultos, exceto em algumas populações remotas da América do

Sul e Ásia (Knowles *et al*, 2001). Após a infecção primária, o BKV se estabelece de forma latente no epitélio urinário podendo se reativar em situações de imunossupressão (Hirsch *et al*, 2002).

Devido à excreção do vírus BK através da urina, é muito provável que a transmissão oral por fômites, comida ou água contaminada seja também uma importante via de transmissão (Bofill-Mas *et al*; 2000 e 2001). Apesar de controversa, a transmissão vertical tem sido proposta baseada na detecção de imunoglobulinas IgM em amostras de sangue de cordão umbilical e de DNA viral em tecidos fetais e placentários (Knowles *et al*, 2001). Outras potenciais rotas de transmissão do BKV incluem a via sexual, a transfusão de componentes sanguíneos e o transplante de órgãos, principalmente transplantes renais alográficos (Andrews *et al*, 1998; Dolei *et al*, 2000; Shah *et al*, 2000; Zambrano *et al*, 2002).

Estudos envolvendo crianças com doenças respiratórias revelaram uma elevada porcentagem de tecidos amigdalares contendo formas não integradas de DNA de BKV (Goudsmit *et al*, 1982). Do mesmo modo, a presença de DNA de JCV em linfócitos B e células estromáticas da orofaringe de tais pacientes sugerem a possibilidade de transmissão respiratória dos poliomavirus (Monaco *et al*, 1998).

Devido à capacidade de latência do BKV no rim, não é de se surpreender que o doador possa ser uma importante fonte de infecção em transplantes renais. A soropositividade do doador tem sido relacionada ao desenvolvimento de *viruria* (presença de vírus na urina), *viremia* (presença de vírus no plasma sanguíneo) e ainda a nefropatia associada ao BKV

(BKVN) em crianças e adultos submetidos a transplantes desta natureza (Nickeleit *et al*, 2000; Bohl *et al*, 2005). Contudo, os estudos que procuram comprovar o papel do doador na transmissão de BKV através do rim são ainda pouco esclarecedores.

1.4. O POLIOMAVÍRUS BK EM TRANSPLANTE RENAL

Em verdade, uma nova era no estudo do BKV iniciou-se quando a BKVN foi diagnosticada por Purighalla *et al*, em 1995, através de biópsia renal de um paciente transplantado com suspeita de rejeição aguda. Nos anos seguintes, diversos casos de nefropatia associada ao BKV (BKVN) foram relatados em centros de transplante de todo o mundo (Randhawa *et al*, 1999; Nickeleit *et al*, 2000; Ramos *et al*, 2002; Hariharan *et al*, 2006). Nos dias de hoje, é consenso entre os pesquisadores que a “epidemia” de BKVN verificada a partir da década de 90 esteja associada ao aumento da aplicação de potentes drogas imunossupressoras, tais como tacrolimus, mofetil-micofenolato (MMF) e sirolimus.

Atualmente é reconhecida a importância clínica dos poliomavírus, especialmente a morbidade relacionada à infecção por BKV em pacientes submetidos a transplante renal (Hirsch *et al*, 2005A).

A característica mais evidente da infecção por BKV em pacientes submetidos a transplante renal é a ausência de febre, mal-estar, mialgias, leucopenia, anemia, trombocitopenia ou outros sinais e sintomas típicos de

infecção viral, mesmo com cargas virais elevadas, superiores a um bilhão de cópias/mL na urina ou 100.000 cópias/ml no sangue (Brenann *et al*, 2005; Bressollette-Bodin *et al*, 2005).

A infecção pelo BKV pode estar associada ao aparecimento de doenças do trato urinário, tais como cistite hemorrágica e estenose, e mais frequentemente, ao desenvolvimento de nefropatias (Kwak *et al*, 2002). Níveis elevados de BKV detectáveis em amostras de plasma de pacientes transplantados podem indicar o surgimento de nefrite intersticial associada (Hirsch *et al*, 2002).

De acordo com estudos retrospectivos publicados entre 1978 e 2003, a prevalência de nefropatia associada aos poliomavírus em receptores de transplante renal pode variar entre 1% a 7% (Mackenzie *et al*, 1978; Howell *et al*, 1999; Nickleit *et al*, 2000; Barri *et al*, 2001; Li *et al*, 2002; Ramos *et al*, 2002; Smith *et al*, 2002; Kang *et al*, 2003; Mengel *et al*, 2003; Rahaminov *et al*, 2003; Trofe *et al*, 2003).

O primeiro estudo prospectivo que avaliou a replicação do BKV e o desenvolvimento de BKVN foi elaborado por Hirsch *et al* (2002). Tal estudo incluiu 78 pacientes submetidos a transplante renal que receberam terapia imunossupressiva constituída por tacrolimus (37 pacientes) e MMF (41 pacientes). As técnicas de diagnóstico utilizadas neste estudo foram: citologia em urina para detecção de “decoy-cells”, ou seja, células infectadas pelo BKV que apresentam modificações morfológicas visíveis e inclusões intranucleares; reação em cadeia por polimerase em tempo real para determinação da carga viral plasmática; imunohistoquímica com anticorpos

monoclonais em biópsia renal para avaliação de BKVN. Os resultados indicaram uma incidência de 30% para a presença de “decoy-cells” na urina, 13% para viremia e 8% para o desenvolvimento de BKVN. Assumindo-se a biópsia renal como “padrão-ouro” para o diagnóstico de BKVN, a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da técnica citológica foram respectivamente de 100%, 71%, 29% e 100%. Por seu lado, a técnica de PCR em tempo real para detecção de DNA viral em plasma apresentou um desempenho semelhante à citologia, exceção feita ao valor preditivo positivo, que neste caso foi de 50%. Por esta razão, os autores consideraram o ensaio de quantificação do BKV em sangue – viremia - como o mais indicado marcador diagnóstico para a triagem de casos de BKVN.

Brenann *et al*, em 2005, compararam a incidência da replicação do BKV em urina e sangue bem como o desenvolvimento de nefropatia em pacientes submetidos a transplante renal sujeitos a dois tipos de terapia imunossupressora: tacrolimus ou ciclosporina. Em um ano, 35% de 200 pacientes desenvolveram viruria, 11,5% desenvolveram viremia e não foi diagnosticado nenhum caso de nefropatia associada ao BKV. Não houve diferença significativa quando comparada a incidência entre os dois grupos de pacientes submetidos a diferentes terapias.

As prevalências de viruria e viremia por BKV em pacientes transplantados renais foram também avaliadas em estudo prospectivo de Pang *et al*, em 2007. Recorrendo a técnica quantitativa de PCR em tempo real, os autores encontraram prevalências de 100% em urina e 100% em

plasma de pacientes com BKVN comparativamente a prevalências de 23% em urina e 3,9% em plasma de pacientes em rotina de acompanhamento pós-transplante (Pang *et al*, 2007).

Outro estudo prospectivo envolvendo a replicação do BKV em pacientes transplantados foi escrito por Alméras *et al* (2008). Os autores procuraram associar se a redução da terapia imunossupressora (tacrolimus, MMF, sirolimus e prednisona) em pacientes com viremia (“provável BKVN”) poderia prevenir o desenvolvimento de “BKVN definitiva”. De um total de 123 pacientes, 48,8% amostras foram positivas para a presença de DNA viral em urina, 10,5% em plasma e 2,4% dos pacientes desenvolveram BKVN. Após a redução da imunossupressão em onze pacientes virêmicos sem BKVN, nove (69%) tornaram-se negativos para a presença do vírus no sangue, um (8%) apresentou redução da carga viral, 2 (15%) permaneceram com viremia estável e apenas um (8%) apresentou aumento na viremia. Entretanto, é importante salientar que este estudo não foi controlado, pelo que novos estudos que incluam grupos controle devem ser desenvolvidos para um melhor esclarecimento entre a relação da imunossupressão e a replicação do BKV.

Até a presente data, poucos estudos incluem a pesquisa do vírus JC em pacientes submetidos a transplante renal e casos isolados de nefrite têm sido atribuídos ao vírus (Dorries *et al*, 1983; Hirsch *et al*, 2005B; Kazory *et al*, 2003; Randhawa *et al*, 2005 A e B).

O trabalho mais relevante envolvendo JC em transplante renal foi desenvolvido por Drachenberg *et al* em 2007. Ao acompanharem uma coorte

constituída por 980 pacientes submetidos a transplante renal entre 2002 e 2005, determinaram que a incidência de nefropatia associada ao BKV foi de 5,5% ao passo que a incidência de nefropatia associada ao vírus JC foi de 0,9%.

Os mesmos autores concluíram ainda que as nefropatias associadas a cada um dos polimomavírus são morfologicamente indistinguíveis e que a principal diferença entre o monitoramento de cada vírus consiste na forte associação entre viremia e o desenvolvimento de BKVN do BKV comparativamente ao vírus JC.

1.5. FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO BKV

A nefrite intersticial associada ao BKV (BKVN) provavelmente é causada pela interação de diversos fatores de risco, entre os quais se incluem a imunodepressão e fatores associados ao paciente, ao órgão transplantado e ao próprio vírus (Hirsch *et al*, 2005a).

A utilização de drogas imunossupressoras é tida como o principal fator de risco para o desenvolvimento de BKVN (Mathur *et al*, 1997; Binet *et al*, 1999; Hodur *et al*, 2002). Existem ainda poucos estudos que avaliaram o tipo e a duração do regime de imunossupressão mais adequado para diminuição do risco de nefrite intersticial em tais pacientes (Hirsch *et al*, 2003B). Contudo, com poucas exceções, a BKVN tem sido diagnosticada em pacientes que receberam uma terapia imunossupressora contendo três

principais drogas: inibidores de calcineurina, antimetabólitos e corticoesteróides. A partir do incremento no uso de novas drogas a partir da década de 1990, a maioria dos pacientes recebem combinações contendo tacrolimus e micofenolato mofetil (MMF) (Hirsch *et al*, 2003b).

Entretanto, é importante salientar que existem estudos demonstrando a ocorrência de BKVN em pacientes transplantados renais que não estão recebendo tacrolimus ou MMF (Hirsch *et al*, 2003A; Sachdeva *et al*, 2004). Desta forma, ainda não está esclarecida a associação entre uma determinada droga e o desenvolvimento de BKVN.

Além das drogas imunossupressoras, o desenvolvimento de BKVN está associado a fatores de risco inerentes ao paciente, tais como a idade avançada e o sexo masculino (Ramos *et al*, 2002; Trofe *et al*, 2003), etnia branca (Trofe *et al*, 2003), *diabetes mellitus* (Hogan *et al*, 1980; Randhawa *et al*, 1999; Barri *et al*, 2001) e sorologia negativa para o BKV em receptores pediátricos (Ginevri *et al*, 2003; Smith *et al*, 2004). Entretanto, uma sorologia pré-transplante positiva para o BKV não confere proteção ao indivíduo contra a replicação viral, viremia e BKVN (Hirsch *et al*, 2002; Brennan *et al*, 2005).

Por outro lado, é sugerido que o órgão transplantado também possa ser um fator de risco para o aparecimento de BKVN devido ao fato de que tal patologia é rara em recipientes de transplantes de rim autólogos, mesmo quando sujeitos as mesmas condições de imunossupressão (Haririan *et al*, 2003; Hirsch *et al*, 2003 B; Limaye *et al*, 2005). Valores crescentes no risco de replicações do BKV e consequente desenvolvimento de BKVN têm sido associados a um elevado número de *mismatches* do HLA (antígenos

leucocitários humanos) (Hirsch *et al*, 2002; Mengel *et al*, 2003; Awadalla *et al*, 2004; Bohl *et al*, 2005).

Ainda não está totalmente esclarecida a influência do doador na origem e desenvolvimento de complicações clínicas associadas aos poliomavírus.

Bohl *et al* (2005) em estudo prospectivo analisaram amostras de sangue pré-transplante de receptores e doadores de rim com o objetivo de identificar anticorpos anti-BKV e a relação existente entre o *status* sorológico dos envolvidos e o aumento da carga viral do vírus. Os resultados indicaram que a maioria dos receptores que desenvolveram infecção por BKV receberam rim de doadores soropositivos. O aparecimento de virúria em receptores de rim de doadores soronegativos ocorreu mais tarde do que naqueles que receberam rim de doadores soropositivos. Além disso, nenhum receptor de rim de doador soronegativo desenvolveu viremia por BKV, o que reforça a teoria de que o doador apresenta um papel relevante na ativação dos poliomavírus.

O mesmo estudo procurou avaliar a importância do subtipo do vírus no desenvolvimento de nefropatias em transplantados renais. Embora a maioria dos receptores apresentasse infecção pelo subtipo I do BKV, não houve associação entre o subtipo do vírus e tal patologia. Tal achado foi corroborado por Tremolada *et al* (2010B) que, ao sequenciarem amostras de urina e do plasma da região polimórfica da VP1 em pacientes com diagnóstico de BKVN, não encontraram correlação entre o subtipo do BKV e o desenvolvimento clínico da doença.

De modo a determinar a possível influência do doador de rim na origem da infecção pelo BKV, Vera-Sampere *et al* (2006) monitoraram a excreção do vírus em 55 doadores de rim e seus respectivos receptores durante um ano. Análises genotípicas da região de controle de transcrição do BKV (TCR) das amostras positivas revelaram que quatro pares doador-receptor apresentaram sequências genéticas idênticas, comprovando-se que, pelo menos em algumas amostras, o doador foi à origem da infecção pelo BKV. Interessante também o fato de que, entre um dos pares citado, a sequência genética do vírus BKV do doador ter sido idêntica a dos dois receptores, reforçando ainda mais esta hipótese.

Estudos desta natureza, que procuram estabelecer associações entre a importância do doador e do enxerto no desenvolvimento da infecção pelos poliomavírus, são escassos e normalmente apresentam um reduzido número de amostras.

Finalmente, os fatores de risco para o aparecimento de BKVN associados ao vírus incluem mudanças relevantes em epítomos de importância imunológica da proteína do capsídeo viral (VP-1) (Binet *et al*, 1999) e alterações na sequência de regiões não-codificantes que poderiam afetar a expressão e/ou a replicação viral (Randhawa *et al*, 2003).

Estudos recentes incluem a análise e sequenciamento de regiões genéticas dos poliomavirus denominadas “regiões não-codificantes de controle” (NCCRs), importantes para a replicação e coordenação da expressão de genes virais.

Modificações genéticas nas regiões NCCRs do genoma do BKV parecem estar associadas a aumento da viremia e a quadros de nefrite intersticial mais graves.

Olsen *et al* (2006 e 2009), em estudos que compararam as diferenças funcionais entre variantes arquetípicas (ww-NCCRs) e variantes rearranjadas (rr-NCCRs) do BKV, constataram que as últimas possuem uma maior capacidade de replicação em amostras de pacientes transplantados e podem estar associadas ao desenvolvimento de nefropatias. Entretanto, os autores reforçam a necessidade de esclarecer se a presença de variantes rearranjadas do BKV implica, de fato, em uma maior patogenicidade das mesmas (Olsen *et al*, 2009).

Ao analisarem sequências de NCCRs oriundas de amostras de urina e sangue de pacientes submetidos a transplante renal – incluindo amostras de pacientes com BKVN – Gosert *et al* (2008) concluíram que a presença de variantes geneticamente rearranjadas (rr-NCCRs) no sangue está estatisticamente associada ao aumento da carga viral virêmica e a biópsia positiva.

Contrariamente ao descrito, Boldorini *et al* (2005A), ao sequenciarem a região da NCCR de amostras de cinco pacientes com nefropatia associada ao BKV concluíram que os rearranjos desta região não parecem estar implicados ao desenvolvimento da doença. Logo, como pôde ser visto, estudos envolvendo um maior número de pacientes devem ser propostos para esclarecer o papel dos rearranjos de NCCRs na patologia do BKV em transplannte renal.

1.6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DOS POLIOMAVÍRUS

Dada à heterogeneidade dos fatores de risco, a replicação do BKV surge como a única característica comum de todos os pacientes transplantados renais em risco de desenvolver nefropatias (Drachenberg *et al*, 1999; Nickeleit *et al*, 2000; Vats *et al*, 2003; Drachenberg *et al*, 2004). Desta forma, a triagem para pesquisa do BKV pode permitir a intervenção precoce com redução significativa da taxa de perda do enxerto (Agha *et al*, 2002; Buehrig *et al*, 2003; Drachenberg *et al*, 2004; Brenann *et al*, 2005; Ramos *et al*, 2003 A e B).

Diferentes testes de triagem para o diagnóstico dos poliomavírus têm sido desenvolvidos, entre os quais se destacam a citologia com demonstração de células contendo inclusões virais (*decoy cells*) em urina, a detecção de DNA do BKV ou mRNA do gene VP-1 em urina (Drachenberg *et al*, 1999; De Las Casas *et al*, 2001; Ding *et al*, 2002; Hirsch *et al*, 2002; Li *et al*, 2002), detecção de DNA em plasma (Brennan *et al*, 2005) e microscopia eletrônica (Drachenberg *et al*, 1999; Howell *et al*, 1999).

Ensaio quantitativo de carga viral baseados em ácidos nucleicos na urina ou no sangue estão sendo amplamente utilizados para o diagnóstico do BKV (Biel *et al*, 2000; Limaye *et al*, 2001; Leung *et al*, 2002; Randhawa *et al*, 2004; Brenann *et al*, 2005). A detecção do vírus no sangue (viremia) é considerada mais preditiva de BKVN do que apenas a detecção de vírus na urina (viruria). No entanto, alguns centros médicos optam por utilizar a citologia como a principal técnica de triagem (Hurault *et al*, 2000; Kazory *et*

al, 2003). Embora a detecção de *decoy-cells* em urina possua uma boa sensibilidade para o monitoramento de BKVN, a reação em cadeia por polimerase (PCR) é quatro vezes mais sensível do que a citologia para o acompanhamento de viruria assintomática (Li *et al*, 2002).

Os resultados de dois importantes estudos prospectivos indicam que a replicação do BKV detectada por citologia (*decoy cells*) ou reação em cadeia por polimerase (PCR) para DNA na urina precede o desenvolvimento de viremia em média de quatro semanas (Hirsch *et al*, 2002; Brennan *et al*, 2005) e a comprovação histológica de BKVN em média de doze semanas (Hirsch *et al*, 2002).

Recomenda-se que os testes de triagem positivos sejam confirmados por testes quantitativos adicionais de maior valor preditivo positivo para a BKVN, tal como a quantificação do DNA no plasma do paciente (Hirsch *et al*, 2001; Limaye *et al*, 2001).

Hirsch *et al* (2005a), procuraram relacionar a carga viral do BKV em amostras de sangue e urina com a presença de BKVN, valores estes ainda não estabelecidos e padronizados nos programas mundiais de transplante renal. Os autores sugerem que valores de carga viral acima de 10^7 cópias de DNA/mL em urina e acima de 10^4 cópias de DNA/mL em sangue, quando persistentes por mais de três meses, são presuntivos de nefropatias e devem ser acompanhados clinicamente e confirmados por biópsia renal. Valores semelhantes de “*cut-off*” tem sido também propostos por outros autores (Randhawa *et al*, 2002)

Entretanto, em estudo de quantificação do BKV em urina de pacientes com BKVN e de um grupo de controle, Tremolada *et al* (2010A) encontraram valores de carga viral urinária acima de 10^7 cópias de DNA/mL, em ambos os grupos, confirmando que o monitoramento dos pacientes renais através da virúria possui um baixo valor preditivo para o diagnóstico de nefropatia associada ao vírus.

Como referido anteriormente, o diagnóstico definitivo de BKVN requer a demonstração de efeito citopático causado pelo BKV através de biópsia renal, pelo que tal técnica é considerada como “padrão-ouro” ou *gold-standard* (Hirsch *et al* 2005a). A análise histológica consiste na identificação de corpos de inclusão nos epitélios tubulares e/ou nas células glomerulares, normalmente associadas à necrose epitelial celular e a danos tubulares agudos (Drachenberg *et al*, 1999; Howell *et al*, 1999; Nickeleit *et al*, 1999; Randhawa *et al*, 1999; Buehrig *et al*, 2003; Nickeleit *et al*, 2003).

Em relação ao diagnóstico laboratorial do JCV, Drachenberg *et al* (2007), com recurso a técnicas citológicas (*decoy-cells*) e moleculares, demonstraram que 27,2% dos pacientes com urina positiva para decoy-cells excretavam JCV e 16,5% excretavam JC concomitantemente com BK. A virúria causada por JCV foi maioritariamente assintomática e a nefropatia associada ao vírus, apesar de menos comum (21,4%), foi caracterizada por mudanças citopáticas esparsas mas com inflamação e fibrose significativa. A incidência da nefrite associada ao JC foi de 0,9% enquanto que a BKVN foi de 5,5%.

1.7. ESTUDOS NO BRASIL ENVOLVENDO O BKV

A maioria dos estudos envolvendo o BKV no Brasil aponta apenas a prevalência do vírus, existindo poucas deles até a data que procurem estabelecer a incidência deste vírus em pacientes submetidos a transplante renal.

Montagner *et al* (2010), recorrendo as técnicas de citologia, PCR “semi-nested” e biopsia, determinaram que a prevalência de “decoy-cell”, virúria e viremia por BKV em pacientes renais foi, respectivamente, de 25%, 61,7% e 42,5%. Interessante foi o fato de não ocorrer viremia positiva entre os pacientes com nefropatia, contrariando alguns autores que defendem que apenas a viremia deva ser considerada para o monitoramento de BKVN (Arthur *et al*, 1989; Marinelli *et al*, 2007).

Em estudo envolvendo 295 pacientes oriundos de três diferentes grupos – transplantados renais, doentes renais crônicos e grupo de controle – Pires *et al* (2011) encontraram prevalências de BKV de 30,5% entre os pacientes transplantados contra 22,4% no grupo de controle. Apenas 3,9% dos pacientes crônicos apresentaram diagnóstico positivo para o vírus. O risco da infecção por BKV foi setenta e duas vezes superior em pacientes renais do que em pacientes assintomáticos (Pires *et al* 2011).

Maia *et al* (2011), em estudo seccional, avaliaram a prevalência de “decoy-cells” em urina de pacientes submetidos a transplantes renais monitorados mensalmente, durante dois anos após o transplante. Cerca de 24% do total dos pacientes apresentaram inclusões virais na urina causadas

por BKV, sendo que destes, mais de 90% após um ano de acompanhamento.

2) JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Apesar de já bem estabelecidas no exterior, existem em nosso meio poucas informações disponíveis sobre a incidência do poliomavírus BK em pacientes submetidos a transplante renal.

A importância de estudos que envolvam vírus latentes e pacientes imunocomprometidos é o constante aumento da incidência de infecções causadas por tais patógenos em transplantados renais, a medida em que novas e potentes drogas imunossupressoras são desenvolvidas e disponibilizadas para o tratamento.

Atualmente, as técnicas moleculares, especialmente a PCR em tempo real, têm sido empregadas para detecção e quantificação destes poliomavírus em amostras clínicas. Contudo, estas técnicas ainda não estão disponíveis nos centros de transplante renais nacionais nem tampouco disponíveis comercialmente, indicando a necessidade de se padronizar as mesmas em nosso meio.

Ainda por ser totalmente estabelecida está a dinâmica de excreção do BKV bem como o papel desenvolvido pelo doador no desenvolvimento de infecção pelo vírus em tal população.

Além disso, análises de substituição de nucleotídeos específicos nas regiões da VP1 e NCCR desse vírus poderá aumentar nosso entendimento sobre os epítomos envolvidos no aparecimento de viremia e BKVN, e no aumento da patogenicidade do BKV.

Por fim, a análise filogenética dos subtipos e subgrupos do poliomavírus BK enriquecerá as informações existentes até a presente data no Brasil, bem como poderão elucidar estratégias futuras de diagnóstico, prevenção e tratamento das nefropatias associadas a estes patógenos.

3) OBJETIVOS DO ESTUDO

3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar a incidência do poliomavírus BK em amostras sequenciais de urina e plasma de pacientes submetidos a transplante renal;

3.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

1. Otimizar uma reação em cadeia por polimerase em tempo real quantitativa (qPCR) da região do gene do antígeno T do BKV.
2. Avaliar a concordância existente entre a técnica de citologia e a reação em cadeia por polimerase em tempo real quantitativa (qPCR) para diagnóstico do poliomavírus BK na urina de receptores de transplante renal.
3. Investigar a dinâmica de excreção urinária e plasmática do poliomavirus BK nos receptores de transplante renal.
4. Determinar os subtipos e subgrupos do poliomavirus BK presentes em amostras dos doadores e receptores de transplante renal e, através de análises de similaridade de sequências e eventuais rearranjos do

gene VP1, avaliar se o vírus detectável no receptor é proveniente do doador.

5. Identificar rearranjos moleculares do gene NCCR do BKV em amostras de urina e plasma, investigando uma possível relação entre tais rearranjos e a evolução para viremia.
6. Fazer a análise filogenética com as cepas obtidas neste estudo e cepas de referência provenientes de outras regiões do mundo disponíveis no *Genbank*

4. CASUÍSTICA E METODOLOGIA

4.1. DESENHO DO ESTUDO

Estudo de coorte, onde será avaliada a incidência de virúria e viremia, a dinâmica de excreção urinária, bem como a análise molecular do vírus BK em pacientes submetidos a transplante renal na Unidade de Transplante Renal (UTR) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

Para avaliação da incidência e da dinâmica de excreção urinária na coorte, foram incluídos no estudo 85 pacientes submetidos a transplante renal, que concordaram em participar voluntariamente do estudo mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Após a inclusão, os pacientes foram monitorados para o desenvolvimento de virúria e viremia por BKV através de coletas de amostras durante doze meses subsequentes ao transplante.

Cabe salientar que esta tese de doutorado faz parte de um projeto maior, intitulado “Infecção pelos poliomavírus humanos BK e JC em pacientes submetidos a transplante renal: seguimento clínico-laboratorial”, financiado pela FAPESP e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq (Processo número 0234/10) – Anexo I.

Logo, para a realização do objetivo 4, algumas amostras de urina que não pertenciam ao pacientes desta coorte, mas que faziam parte do projeto acima referido, foram também incluídas.

4.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Critérios de inclusão:

- Todos os receptores e doadores de transplante renal na Unidade de Transplante Renal (UTR) do HC-FMUSP que receberam/doaram rim entre o período de agosto de 2010 a setembro de 2011, após assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

Critérios de exclusão:

- Receptores que ultrapassaram o limite máximo de 60 dias entre duas coletas seriadas de urina (exceto para objetivo número 4).
- Receptores de transplante simultâneo de rim-pâncreas ou rim-fígado;
- Receptores com dificuldade de coleta seriada de amostras de urina no período pós-transplante, como pacientes com cateterismo vesical intermitente ou com dificuldade de locomoção;
- Receptores e doadores que se não assinaram o TCLE.

4.3. ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo obteve a aprovação pela CAPPesq em 18 de agosto de 2011 (nº protocolo: 0569/11) – Anexo II.

4.4. MONITORAMENTO DAS AMOSTRAS

Durante a internação hospitalar de rotina prévia ao transplante, foram realizadas coletas de urina para pesquisa de *decoy-cell* (citologia) e de virúria (qPCR) além de uma coleta de sangue para pesquisa de viremia por BKV nos receptores. Em transplante “intervivos”, tal pesquisa foi também realizada nos respectivos doadores. Em receptores anúricos, foi realizada apenas a coleta de sangue.

No período pós-transplante, os pacientes foram submetidos ao acompanhamento clínico, tendo recebido drogas imunossupressoras de acordo com as orientações da UTR - Unidade de Transplante Renal do HCFMUSP.

Este consistiu em um esquema de imunossupressão de indução para pacientes com maior risco de rejeição e uma imunossupressão de manutenção para todos os pacientes transplantados. O esquema de imunossupressão foi o suficiente para evitar a rejeição aguda e crônica e possibilitar o funcionamento do enxerto pelo maior período de tempo possível.

A imunossupressão de indução foi utilizada para prevenção de rejeição aguda pós-transplante e foi indicada para os grupos de receptores com maior risco de rejeição. Estes receberam anticorpos policlonais anti-timócitos (ATG ou timoglobulina), que normalmente causam uma profunda depleção de linfócitos por um período de cerca de seis meses.

Pacientes com menor risco de rejeição receberam anticorpos monoclonais anti-receptor de interleucina 2 (Daclizumab ou Baxilimab).

A terapia de manutenção consistiu em um esquema de duas ou três drogas, sendo obrigatoriamente uma delas a prednisona. As demais drogas disponíveis e utilizadas pela UTR foram os inibidores de calcineurina (ciclosporina ou tacrolimus), agentes anti-metabólicos (azatioprina ou micofenolato mofetil/micofenolato sódico), e os inibidores da mTOR (sirolimus ou everolimus).

Paralelamente ao acompanhamento clínico foi realizado um monitoramento laboratorial, alvo principal do presente estudo, para detecção da presença do poliomavírus BK na urina e no sangue dos receptores por um período de doze meses pós-transplante.

As amostras coletadas após o transplante respeitaram um período máximo de 60 dias entre uma e outra coleta. Amostras que não se enquadraram nestes limites foram desconsideradas, e os respectivos receptores foram excluídos do estudo de acompanhamento da coorte.

A coleta de sangue para detecção de viremia pelo BKV, inicialmente, seguiu a rotina previamente estabelecida na Unidade de Transplante Renal para vigilância de nefropatia por BKV, ou seja, encaminhamento do paciente para coleta de sangue quando a urina apresentava pesquisa de *decoy-cell* positiva. Contudo, durante o estudo, foi feito um adendo ao protocolo original do projeto, e passou-se a solicitar qPCR no plasma na coleta subsequente de todos os pacientes que apresentavam urina positiva para o BKV, por pelo menos uma das técnicas de triagem - pesquisa por *decoy-cell* e/ou qPCR.

Algumas das amostras de urina e plasma positivas para a presença do vírus BK foram posteriormente sequenciadas nas regiões dos genes da

VP1 ou da NCCR, conforme objetivos deste estudo. A figura 2 elucida o acompanhamento das amostras coletadas ao longo do monitoramento laboratorial.

Figura 2: Fluxograma mostrando as etapas do monitoramento das amostras de urina e de plasma para detecção do poliovírus BK.

4.5. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de urina foram coletadas, em duas alíquotas, pela Unidade de Transplante Renal (UTR) do HC-FMUSP. Após a coleta, uma das alíquotas foi encaminhada ao Laboratório de Anatomia Patológica do HC-FMUSP para análise citológica, conforme descrito por Coleman (1975).

Os casos positivos foram submetidos a uma avaliação das células com inclusões virais, de acordo com o descrito por Boldorini *et al* (2005B). A outra alíquota de urina, bem como as amostras de sangue, foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia da FMUSP para extração do DNA viral e posterior determinação das cargas virais urinária e plasmática por qPCR.

Para a extração de DNA, as alíquotas de urina foram submetidas a centrifugação para sedimentação a 5000 rpm durante 5 minutos. 70µl do sedimento remanescente foi eluído em 70µl de urina não-sedimentada perfazendo-se um volume total de 140µl (Krumbholz *et al*, 2006). As amostras de sangue foram submetidas a uma centrifugação de 1500rpm durante 10 minutos, de modo a ser extraído somente material genético do plasma sanguíneo. Os produtos de urina e plasma obtidos foram posteriormente processados com o kit *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen) conforme recomendações do fabricante.

Todas as amostras de DNA foram armazenadas a - 80° C e alíquotas das amostras de urina e plasma foram também conservadas para possíveis repetições e futuros estudos.

4.6. OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA POR POLIMERASE QUANTITATIVA (qPCR) PARA DETECÇÃO DO GENE DO ANTÍGENO T DO BKV

Quando comparada às técnicas de PCR convencionais, o PCR quantitativo em tempo real (qPCR) possui as vantagens de detectar o produto de amplificação “ciclo-a-ciclo” e possibilitar a quantificação da carga viral. Além dos *primers*, é também incluída nesta reação uma sonda (*TaqMan*[®] - Applied Biosystems) com capacidade de absorver fluorescência emitida por um fluoróforo. Desta forma, conforme os ciclos da reação de PCR vão se sucedendo, a fluorescência gerada é cada vez maior.

Quando a fluorescência atinge um limiar, correspondente à fase exponencial, o *software* do sistema infere o ciclo da mesma (Ct) às informações decorrentes de uma curva-padrão, o que possibilita a quantificação das amostras clínicas.

4.6.1. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CICLOS E DA CONCENTRAÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

A otimização da reação de qPCR para detecção do BKV iniciou-se com a determinação da concentração de *primers* e sondas correspondentes ao gene do antígeno T, descritos por Pal *et al* (2006). Para tal, foram utilizadas amostras de urina sabidamente positivas para o BKV, variando-se as concentrações de *primers* (10mM, 15mM, 20mM e 40mM) e de sonda (5 mM, 10mM, 15mM e 20mM).

Além da análise das concentrações dos oligonucleotídeos, foi também otimizada a ciclagem da reação, variando-se o número de ciclos entre 40, 45 50 e 60.

Foram consideradas como “ideais” as concentrações de *primers*/sonda e ciclos que corresponderam ao menor valor de Ct e a maior medida de fluorescência (ΔR_n).

4.6.2. CLONAGEM DE SEGMENTOS ESPECÍFICOS DO BKV

Procedeu-se a construção de plasmídeos que possibilitaram o desenvolvimento de curvas-padrão para a quantificação do vírus BK em amostras de urina e de plasma.

Segmentos de DNA específicos do vírus, obtidos através da reação de PCR, foram inseridos em vetores pUC57 (*GeneScript Corp*, USA). Tais vetores foram submetidos ao processo de transfecção por choque térmico em bactérias *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen). Para tal, 30 μ l das bactérias foram descongeladas e transferidas para um tubo *ependorff* contendo 3 μ l do vetor pUC57 com os segmentos de DNA específicos. Submeteu-se as bactérias durante 30 minutos em gelo, 45 segundos em banho-maria a 42°C e posteriormente a 2 minutos em gelo novamente. Foram acrescentados 9 volumes de meio Luria-Bertani (LB) puro (Gibco®), aguardando-se por 1 hora. Após este período, 100 μ l das bactérias foram transferidas para placa de 10mm contendo ampicilina e incubadas durante 24 horas a 37°C graus.

Após purificação e extração, a concentração de DNA do plasmídeo obtido foi avaliada por espectrofotometria (*Eppendorf Bio Photometer* – Hamburg - Germany) e o número de cópias presente em cada μL da amostra foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula: $\text{Número de cópias} = (\text{Xg}/\mu\text{L DNA} * 6.022 * 10^{23}) / (\text{plasmídeo bp} * 650)$.

4.6.3. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO BKV EM AMOSTRAS CLÍNICAS

Diluições seriadas do plasmídeo, com concentrações que variaram entre de 10^5 e 10^{-2} cópias virais/ μL , foram utilizadas para gerar curvas-padrão e quantificar o número de cópias do genoma do BKV.

A quantificação do número de cópias do BKV em urina e plasma de pacientes submetidos a transplante renal foi realizada através do cálculo da média dos valores do ciclo *threshold* (Ct), obtidos para cada amostra clínica, e a respectiva “plotagem” destes nas retas de regressão linear, obtidas a partir da curva-padrão. Todas as amostras clínicas analisadas foram feitas em “duplicata”, de modo a garantir a reprodutibilidade dos resultados.

4.6.4. DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA DA qPCR

De modo a se determinar a sensibilidade analítica desta técnica, foram submetidas diluições seriadas do plasmídeo do BKV acima descritas à amplificação, sendo que cada diluição foi repetida por dez vezes (teste em decuplicata).

A reprodutibilidade intratestes foi avaliada através do cálculo de coeficientes de variação dos C_t obtidos das decaplicatas das diluições 10^2 , 10^1 , 10^0 e 10^{-1} cópias virais/ μL do plasmídeo. A reprodutibilidade intertestes foi avaliada através do emprego de três diluições com concentrações conhecidas do DNA padrão, testadas em duplicata, a cada reação.

4.6.5. DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DA qPCR

De modo a se determinar a especificidade desta técnica, vinte amostras de urina e dez amostras de plasma sabidamente positivas para o vírus JC, que apresenta elevada identidade com o BKV, foram testadas. Além destas, foram ainda testadas quatro amostras padrão do vírus SV40, que também pertence à família *Polyomaviridae*.

4.7. CORRELAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE qPCR E CITOLOGIA PARA DETECÇÃO DO BKV NA URINA DE RECEPTORES

A comparação entre as técnicas de qPCR e citologia para detecção da presença de BKV foi realizada pela análise de amostras pareadas de urina, ou seja, uma mesma amostra foi diagnosticada simultaneamente pelas duas técnicas. A análise estatística foi desenvolvida com recurso ao teste de concordância *Kappa* (Fleiss, 1981).

Este teste descreve a intensidade da concordância entre dois ou mais métodos ou testes, baseando-se no número de respostas concordantes, ou seja, no número de casos cujo resultado é o mesmo entre os testes. O *Kappa* é uma medida de concordância interobservador e mede o grau de concordância além do que seria esperado tão somente pelo acaso. Esta medida de concordância tem como valor máximo o “1”, valor que representa o máximo de concordância e o “0”, que indica ausência de concordância.

4.8. DETERMINAÇÃO DA INCIDÊNCIA DO BKV EM RECEPTORES DE TRANSPLANTE RENAL

A incidência do BKV em receptores de transplante renal foi calculada através da densidade de incidência, que corresponde ao número de casos novos de virúria/viremia entre os receptores considerando-se o tempo de observação.

Logo, o cálculo da densidade de incidência foi feito pelo número de novos casos de virúria/viremia divididos pela somatória do número de indivíduos em risco ao longo do seguimento, multiplicados pelo tempo de observação:

$$\text{Densidade de Incidência} = \frac{\text{número de casos}}{\sum n\Delta t} \times 100$$

4.9. AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DE EXCREÇÃO URINÁRIA E PLASMÁTICA DO BKV EM RECEPTORES DE TRANSPLANTE RENAL

Através da detecção do DNA do BKV em amostras seriadas de urina e plasma coletadas mensalmente após o transplante, foi avaliada a dinâmica de excreção urinária bem como a proporção de pacientes virúricos e virêmicos nos diferentes meses, os valores preditivos da qPCR e citologia para determinação de viremia além do impacto da excreção de BKV no período pré-transplante.

Foram também construídas curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier. A análise de sobrevivência é um processo estatístico, utilizado na análise de dados, para a qual a variável de interesse é o tempo que decorre até que um acontecimento se verifique.

Calcula-se o tempo de sobrevivência iniciando-o em um ponto de partida inerente ao estudo, no caso o transplante, até ao ponto em que o indivíduo alcança o limite de tempo de interesse – no caso, viruria e viremia.

A curva de Kaplan-Meier é um método não paramétrico, sendo o único que supõe que os indivíduos censurados comportaram-se do mesmo modo que os indivíduos seguidos, até que ocorra o evento.

4.10. GENOTIPAGEM DO BKV EM AMOSTRAS DE DOADORES E RECEPTORES DE TRANSPLANTE RENAL

Para amplificação e posterior determinação dos genótipos do BKV presentes em amostras dos doadores e receptores foi utilizado o protocolo descrito por Krumbholz *et al* (2006).

4.11. IDENTIFICAÇÃO E COMPARAÇÃO DE REARRANJOS MOLECULARES NO GENE VP1 DO BKV EM AMOSTRAS DE URINA DE DOADORES E RECEPTORES DE TRANSPLANTE RENAL

Através da amplificação de segmentos da região do gene VP1 do BKV e posterior análise filogenética, foram comparadas as amostras de BKV detectadas nos doadores e nos receptores para verificar o grau de identidade existente entre elas e eventuais rearranjos moleculares, de modo a tentar confirmar se o vírus oriundo do doador é o mesmo excretado pelo receptor.

O protocolo de PCR utilizado para amplificação das amostras incluiu a seqüência alvo amplificada em reação com volume final de 40 µl contendo 10,0 µl de DNA da amostra; 5,0 µl de tampão (10X); 4,0 µl de dNTPs (5,0 mM); 1,5 µl de MgCl₂ (50mM); 1,0 µl de cada *primer* BK-IF e BK2 (15,0 mM); 17,1 µl de água DEPC e 0,4 µl de Platinum Taq DNA Polimerase 5,0 U/µl (Invitrogen, CA, EUA).

Submeteram-se os tubos de reação contendo a amostra e a mistura de reagentes à amplificação em termociclador *Eppendorf Gradient* (*Eppendorf*, Hamburgo, Alémanha) como se segue: 5 minutos a 94° C para

denaturação do DNA; 30 segundos a 94° C, 45 segundos a 52° C para anelamento dos primers, 1 minuto a 72° C para extensão da sequência repetidos por 40 ciclos, ainda uma extensão final a 72° C durante 7 minutos.

A tabela 1 mostra as sequências dos *primers* utilizados nesta reação.

Tabela 1: Denominação, sequência de nucleotídeos e respectivas posições dos primers utilizados para genotipagem e análise molecular da região do gene da VP1 do BKV. O *primer* BK-IF foi descrito por Tremolada *et al* (2010A) enquanto que o *primer* BK2 foi adaptado do mesmo estudo, incluindo-se bases degeneradas. Posições dos nucleotídeos de acordo com o genoma completo do BKV descrito por Seif *et al* (1979).

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5'- 3')</i>	<i>Posições</i>
BK-IF (<i>forward</i>)	AGTGCCAAAAC TACTAATAAAAG	1.623-1.654
BK2 (<i>reverse</i>)	AAATTGGGTAAGGRTTYTTYACA	2.470-2.448

Foram selecionados pares “doador-receptor” que apresentaram amostras de urina positivas: no caso dos doadores, esta correspondia à amostra pré-transplante e no caso dos receptores, foi selecionada uma das amostras positivas detectadas ao longo do período pós-transplante.

Cabe ressaltar que, para se obter o maior número de pares possível, as amostras de urina não pertenceram necessariamente aos doadores e receptores da coorte.

4.12. IDENTIFICAÇÃO E COMPARAÇÃO DE REARRANJOS MOLECULARES NO GENE NCCR DO BKV EM AMOSTRAS DE URINA E PLASMA DE RECEPTORES DE TRANSPLANTE RENAL

Como a região NCCR é altamente variável, foi verificado se eventuais rearranjos moleculares nesta região poderiam estar associados à presença de viremia e a um eventual aumento da carga viral urinária e plasmática.

Para tal, foram selecionadas e testadas por qPCR conjuntos de três amostras (“tripletos”) oriundas do receptor virêmico, a saber: uma amostra de plasma com viremia e duas amostras de urina, uma que precedia e outra concomitante à data da viremia.

O protocolo de “*semi-nested*” PCR para amplificação da região NCCR possuía uma amplificação inicial ou primeiro “round” com os *primers* AgnF e AgTR e um segundo “round” com os *primers* Brp1 e AgTr. O *primer* Brp1 foi descrito por Boldorini *et al* (2005A) enquanto que os *primers* AgnF e AgTR foram desenhados no Laboratório de Virologia da FMUSP (tabela 2).

Tabela 2: Denominação e sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados para análise molecular da região do gene NCCR do BKV. Posições dos nucleotídeos de acordo com o genoma completo do BKV descrito por Seif *et al* (1979).

Primer	Sequência (5'- 3')	Posições
AgnF	ctatccaaaccaagggctctt	4772-4794
AgTR	aagggattacttacctaggagtc	603-622

A amplificação inicial incluiu uma reação com volume final de 50 µl contendo 10,0 µl de DNA da amostra; 5,0 µl de tampão (10X); 4,0 µl de

dNTPs (2,5 mM); 1,5 µl de MgCl₂ (50mM); 1,0 µl de cada *primer* AgnF e AgTR (10,0 mM); 18,1 µl de água DEPC; 4,0 µl de Glicerol 57%; 5,0 µl de Cresol Red (2,5µg/µl) e 0,4 µl de Platinum Taq DNA Polimerase 5,0 U/µl (Invitrogen, CA, EUA). Submeteram-se os tubos de reação contendo a amostra e a mistura de reagentes à amplificação em termociclador *Eppendorf Gradient* (*Eppendorf*, Hamburgo, Alemanha) como se segue: 10 minutos a 94° C para denaturação do cDNA; 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 50° C para anelamento dos *primers*, 1 minuto a 72° C para extensão repetidos por 35 ciclos, e uma extensão final a 72° C durante 7 minutos.

A segunda amplificação incluiu uma reação com volume final de 50 µl contendo 5,0 µl de DNA da amostra; 5,0 µl de tampão (10X); 4,0 µl de dNTPs (2,5 mM); 1,5 µl de MgCl₂ (50mM); 1,0 µl dos *primers* Brp1 e AgTr (10,0 mM); 23,1 µl de água DEPC; 4,0 µl de Glicerol 57%; 5,0 µl de Cresol Red (2,5µg/µl) e 0,4 µl de Platinum Taq DNA Polimerase 5,0 U/µl (Invitrogen, CA, EUA). A reação em termociclador teve uma ciclagem como se segue: 10 minutos a 94° C para denaturação do cDNA; 1 minuto a 95° C, 1 minuto a 55° C para anelamento dos *primers*, 1 minuto a 72° C para extensão da sequência repetidos por 35 ciclos, e ainda uma extensão final a 72° C durante 7 minutos.

4.13. ANÁLISE MOLECULAR DOS PRODUTOS DE PCR

4.13.1. PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS

A purificação dos produtos amplificados – fragmentos das regiões da VP1 e da NCCR - foi realizada com o kit *QIAQuick PCR Amplification Kit*

(Qiagen[®]), conforme instruções do fabricante. Após o termino da purificação das amostras positivas, uma eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo 0,5 µL /mL de brometo de etídeo em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) (1X), foi realizada para uma semi-quantificação do produto amplificado, utilizando como marcador o *Low DNA Mass Ladder* (Gibco[®]).

4.13.2. SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS POSITIVAS

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados utilizando o mesmo par de *primers* empregado nas respectivas reações de amplificação.

Os produtos de PCR purificados e quantificados foram adicionados a uma mistura contendo 4µl de *Ready Reaction Premix 2.5X*, 1,5 µl de *BigDye Sequencing* (Applied Biosystems), 3,2 pmol de cada primer e água para um volume final de 20µl. Após a reação de sequenciamento, os nucleotídeos terminadores foram removidos para a eletroforese. A remoção dos terminadores consistiu em uma lavagem com isopropanol 75% seguida por outra lavagem com Etanol 70%. Os produtos purificados foram ressuspensos em formamida 10% e submetidos à eletroforese em no equipamento *ABI PRISM 3100 Genetic Analyser* (Applied Biosystems).

4.13.3. CLASSIFICAÇÃO GENOTÍPICA E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Para a análise filogenética e determinação de genótipos, as sequências do gene da VP1 geradas, com tamanhos de 241 (fragmento menor) e 549 (fragmento maior), foram alinhadas com sequências de referência obtidas no banco de dados públicos *GenBank*, utilizando o programa *Clustal X* (Thompson *et al*, 1994). Os arquivos alinhados e salvos no formato 'nexus' foram então submetidos à reconstrução filogenética por Máxima Verossimilhança (MV) no programa *Garli v0.9* (Genetic Algorithm for Rapid Likelihood Inference) (Zwickl, 2006). Este programa reconstrói árvores filogenéticas através do método de máxima verossimilhança, sem a necessidade de um modelo de substituição previamente estabelecido. Isso se dá pelo fato do programa utilizar um algoritmo que otimiza os parâmetros iniciais do modelo de substituição durante a busca, permitindo que as topologias a serem geradas sejam otimizadas a cada geração. Múltiplas e independentes corridas foram realizadas em busca da melhor árvore, a qual foi atribuído suporte de ramos através de *bootstrap* com 1000 réplicas. As árvores finais foram visualizadas no programa "*FigTree*" (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Os segmentos do BKV foram também analisados quanto à presença de substituições de nucleotídeos e aminoácidos específicos. A inspeção visual do alinhamento, bem como a tradução da sequência de nucleotídeos para aminoácidos, foi realizada no programa de visualização e edição de sequências *Se-AI* (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>).

4.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA

De modo a averiguar a relação entre as variáveis categóricas e os desfechos de viruria ou viremia, foram utilizados os testes do X^2 (qui-quadrado) e o teste exato de Fisher. Para variáveis quantitativas foi utilizado o teste de *t-student*.

Toda a análise estatística foi realizada recorrendo ao programa SPSS 20.0 para Windows (IBM®).

A análise de sobrevivência para desenvolvimento de viruria e viremia foi calculada através de curvas de Kaplan-Meier.

Para comparação da correlação entre as técnicas de citologia e qPCR foi utilizado o teste de Kappa (Fleiss, 1981).

5. RESULTADOS

5.1. OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA POR POLIMERASE QUANTITATIVA (qPCR) PARA DETECÇÃO DO GENE DO ANTÍGENO T DO BKV

5.1.1. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CICLOS E DA CONCENTRAÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

Foram consideradas como “ideais” as concentrações de primers e sonda de 10 μ M e 5 μ M, respectivamente, que corresponderam ao menor valor de Ct e a maior medida de fluorescência (ΔR_n).

A reação final foi preparada com 12,5 μ l de “*TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)*” (Applied Biosystems, USA), 0,5 μ l de cada *primer* (10 μ M), 0,5 μ l da sonda (5 μ M), 6 μ l de água DEPC e 5 μ l da amostra. Os parâmetros da reação foram de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos de 45 ciclos (15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C), submetidos em equipamento *ABI 7300* (Applied Systems, USA).

5.1.2. QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO BKV EM AMOSTRAS CLÍNICAS

Conforme referido, diluições seriadas do plasmídeo, com concentrações que variaram entre de 10⁵ a 0,01 cópias virais/ μ L, foram utilizadas para gerar curvas-padrão e quantificar o número de cópias do genoma do vírus BKV (Figura 3).

Figura 3: Amplificação de curvas-padrão por técnica de reação em cadeia por polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). Cada curva representa diluições seriadas do plasmídeo (controle positivo) contendo segmento específico do BKV. Os números indicam a concentração do plasmídeo em cópias/ μ l.

A quantificação do número de cópias do BKV em urina de pacientes submetidos a transplante renal foi realizada através do cálculo da média dos valores do ciclo threshold (Ct) obtidos para cada amostra clínica e a respectiva “plotagem” destes nas retas de regressão linear obtidas a partir das curvas-padrão de cada vírus (Figura 4). Obteve-se uma reta de regressão linear com um índice de correlação de 0,999, próxima ao ideal.

Figura 4: Reta de regressão linear das curvas-padrão do vírus BKV. Concentrações das diluições do plasmídeo: 1 cópia/μL, 10 cópias/μL, 100 cópias/μL e 1000 cópias/μL.

5.1.3. DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA DA qPCR

Conforme demonstrado anteriormente nas figuras 3 e 4, a sensibilidade analítica da técnica de qPCR para o vírus BKV foi de aproximadamente 1 cópia/μL ou 1.000 cp/mL, resultado semelhante ao recomendado por diversos autores (Hirsch *et al*, 2005a; Randhawa *et al*, 2002). De modo a garantir a reprodutibilidade dos resultados, cargas virais inferiores a 1 cópia/μL ou 1.000 cp/mL foram consideradas negativas ou indetectáveis, ou seja, estavam abaixo da capacidade de detecção e quantificação do teste ou *cut-off*. Por outro lado, concentrações superiores a este valor, após terem sido repetidamente testadas, foram consideradas positivas ou detectáveis (Tabela 3).

Tabela 3: Determinação do *cut-off* da reação de qPCR para BKV através de diluições seriadas do plasmídeo, testadas em decuplicatas (curvas 1 a 10).

Nº cp/µL	curva 1	curva 2	curva 3	curva 4	curva 5	curva 6	curva 7	curva 8	curva 9	curva 10	Média	DP
100	pos	pos	pos	pos	Pos	Pos	pos	pos	pos	pos	10	0
10	pos	pos	pos	pos	Pos	Pos	pos	pos	pos	pos	10	0
1	pos	pos	pos	pos	Pos	Pos	pos	pos	pos	pos	10	0
0,1	neg	pos	neg	pos	Pos	Pos	pos	neg	pos	neg	6	4
0,01	neg	neg	neg	neg	Neg	Neg	neg	neg	neg	neg	0	10

Nº Cp/µL- número de cópias de plasmídeo por µL; DP- desvio-padrão; Pos- PCR positivo; Neg- PCR negativo

No que diz respeito à análise intratestes, a reação de qPCR para o BKV mostrou elevada reprodutibilidade, já que os valores de desvio-padrão obtidos a partir de “decuplicatas” de três diluições do plasmídeo foram próximas a zero (Tabela 4).

Tabela 4: Desvios-padrão referentes à decuplicata de três diluições do plasmídeo de BKV. Cópias por reação medidas em cp/µL.

Nº cp/µL	curva 1	curva 2	curva 3	curva 4	curva 5	curva 6	curva 7	curva 8	curva 9	curva 10	Média	DP
100	27,11	27,06	26,95	25,99	27,14	27,03	27,06	26,96	27,14	27,21	27,04	0,002
10	30,71	30,55	30,33	30,26	30,15	30,49	30,36	30,32	30,31	30,58	30,40	0,005
1	33,49	33,68	33,76	33,68	34,02	34,35	33,92	34,07	34,69	33,26	33,90	-0,030

Nº Cp/µL- número de cópias de plasmídeo por µL

5.1.4. DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DA qPCR

Entre as vinte amostras de urina e dez amostras de plasma sabidamente positivas para o vírus JC e entre as quatro amostras padrão do vírus SV40, nenhuma se apresentou positiva na reação de qPCR, revelando a alta especificidade da reação.

5.2. CORRELAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE qPCR E CITOLOGIA PARA DETECÇÃO DO BKV NA URINA DE RECEPTORES

De modo a se avaliar o desempenho das técnicas para detecção do poliomavírus BK em urina, confrontaram-se os resultados obtidos em amostras pareadas, comparando-os através da análise do índice de correlação Kappa (Fleiss, 1981).

O total de amostras pareadas de urina analisado foi de 814, sendo que destas 350/814 (43,0%) foram consideradas “inconclusivas” pela técnica de citologia, face a 464/814 (57,0%) que apresentaram diagnóstico conclusivo. Para análise comparativa, as amostras pareadas foram divididas em dois grupos: um que incluiu somente os resultados conclusivos (tabela 5) e outro contendo tanto amostras conclusivas quanto inconclusivas por citologia (tabela 6).

Quando analisadas amostras pareadas excluindo-se as inconclusivas por *decoy-cell*, a técnica de qPCR provou ser mais sensível do que a citologia, já que 157/464 amostras (33,8%) foram isoladamente positivas

para o BKV pela técnica de qPCR, enquanto apenas 17/464 (3,7%) foram positivas exclusivamente pela citologia. Em 290/464 (62,5%) das amostras testadas houve concordância entre os dois métodos (tabela 5).

Tabela 5: tabela de dupla entrada comparando os resultados do diagnóstico do BKV em amostras pareadas de urina entre duas técnicas - citologia e qPCR – considerando-se apenas as amostras conclusivas por decoy-cell.

		qPCR		TOTAL
		Negativo	Positivo	
CITOLOGIA conclusiva	Negativo	224	157	381
	Positivo	17	66	83
TOTAL		241	223	464

Para a segunda análise, as amostras inconclusivas foram também consideradas negativas. Neste caso, a técnica de qPCR provou ser ainda mais sensível do que a citologia, já que 293/814 amostras (36,0%) foram isoladamente positivas para o BKV pela técnica de qPCR. Houve concordância entre os dois métodos em 504/814 (61,9%) das amostras (tabela 6).

Tabela 6: tabela de dupla entrada comparando os resultados do diagnóstico do BKV em amostras pareadas de urina entre duas técnicas - citologia e qPCR – considerando-se tanto amostras conclusivas como inconclusivas por decoy-cell.

		qPCR		TOTAL
		Negativo	Positivo	
CITOLOGIA Conc + Inconc	Negativo	438	293	731
	Positivo	17	66	83
TOTAL		455	359	814

Os índices *Kappa* calculados para as duas tabelas foram, respectivamente, 0,284 e 0,150 ($P < 0.001$) para um intervalo de confiança de 95% (Fleiss, 1981). Através da análise de concordância proposta por Landis e Koch (1977) na tabela 7, conclui-se que, no primeiro caso, a correlação entre as técnicas foi fraca enquanto que no segundo a concordância foi pobre.

Tabela 7: Valores do índice Kappa e as respectivas interpretações de concordância (Adaptado de Landis e Koch, 1977)

Índice Kappa	Interpretação
< 0	Sem concordância
0 - 0.19	Concordância pobre
0.20 - 0.39	Concordância fraca
0.40 - 0.59	Concordância moderada
0.60 - 0.79	Concordância substancial
0.80 - 1.00	Concordância quase perfeita

5.3. DETERMINAÇÃO DA INCIDÊNCIA POR BKV EM RECEPTORES DE TRANSPLANTE RENAL

Foram incluídos na coorte 85 receptores, cujas características demográficas estão descritas a seguir, em 5.4.2.

Entre os 85 receptores acompanhados ao longo dos doze meses pós-transplante, 78/85 (91,8%) apresentaram viruria e 22/85 (25,9%) apresentaram viremia em algum momento do seguimento.

A densidade de incidência de viruria entre os receptores foi calculada da seguinte forma:

$$\begin{aligned} \text{Densidade de Incidencia de viruria} &= \frac{n^{\circ} \text{ casos}}{\sum n \Delta t} \times 100 = \\ &= \frac{78}{968,9} \times 100 = 8,1 \text{ casos de viruria por 100 pessoas/mês} \end{aligned}$$

O cálculo acima levou em consideração o tempo de observação e a recorrência dos episódios de viruria apresentados pelos receptores.

Foi também calculada a densidade de incidência de viremia entre os receptores virúricos, mostrada no cálculo a seguir:

$$\begin{aligned} \text{Densidade de Incidencia de viremia} &= \frac{n^{\circ} \text{ casos}}{\sum n \Delta t} \times 100 = \\ &= \frac{22}{636,9} \times 100 = 3,5 \text{ casos de viremia por 100 pessoas/mês} \end{aligned}$$

5.4. AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DE EXCREÇÃO URINÁRIA E PLASMÁTICA DO BKV EM RECEPTORES DE TRANSPLANTE RENAL

5.4.1. RECEPTORES E DOADORES INCLUSOS NA COORTE

Para avaliação da dinâmica de excreção urinária e carga viral do BKV em receptores de transplante renal ao longo do acompanhamento da coorte, foram incluídos no estudo 137 receptores. Destes, 52 (37,9%) foram excluídos ao longo do acompanhamento da coorte, por diferentes causas de abandono listadas na tabela 8. Logo, foram incluídos no estudo 85 receptores.

Tabela 8: Causas de abandono entre os receptores excluídos da coorte.

Causa de abandono	n (%)
Intervalo entre amostras coletadas > 60 dias	29 (55,8%)
Perda de contato telefônico	12 (23,2%)
Perda do enxerto	4 (7,6%)
Óbito	4 (7,6%)
Transplante simultâneo rim-pâncreas	2 (3,9%)
Mudança para outro serviço médico	1 (1,9%)
TOTAL	52/137 (37,9%)

Como pode ser observado, mais de metade dos abandonos foram causados pela falta de adesão dos pacientes às datas de retorno previstas para a coleta seriada de urina, seguido pela falta de comunicação entre os receptores e os responsáveis pelo seguimento.

5.4.2. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E PRESENÇA DO BKV EM URINA DE RECEPTORES E DOADORES

As características demográficas dos receptores e dos doadores vivos incluídos na coorte bem como a respectiva percentagem de amostras de urina positivas para a presença do BKV, determinadas por qPCR, estão presentes nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9: Características demográficas dos 85 receptores incluídos na coorte. Virúria BKV: presença do BKV na urina dos receptores, analisada por qPCR.

	<i>n</i> = 85	<i>Virúria BKV</i>	<i>p</i>
Sexo			0,45*
<i>Masculino</i>	46 (54,1%)	41 (89,1%)	
<i>Feminino</i>	39 (45,9%)	37 (94,9%)	
Raça			0,16**
<i>Branca</i>	52 (61,2%)	48 (92,3%)	
<i>Mulata</i>	17 (20%)	15 (88,2%)	
<i>Negra</i>	7 (8,2%)	7 (100%)	
<i>Parda</i>	5 (5,9%)	5 (100%)	
<i>Amarela</i>	4 (4,7%)	3 (75%)	
Idade			0,17***
<i>0-30</i>	13 (15,3%)	13 (100%)	
<i>31-40</i>	17 (20,0%)	16 (94,1%)	
<i>41-50</i>	13 (15,3%)	12 (92,3)	
<i>51-60</i>	32 (37,6%)	28 (87,5%)	
<i>> 61</i>	10 (11,8%)	9 (90,0%)	
<i>mediana</i>	50		

* Teste exato de Fisher. ** Teste exato de Fisher comparando raças “branca” e “não-branca”. *** Teste de *t student*

Não houve relação estatisticamente significativa entre a presença do BKV na urina dos 85 receptores incluídos na coorte e a idade, sexo ou raça dos mesmos.

Entre os doadores, 54 (63,5%) eram falecidos e 31 (36,5%) eram vivos. Entre os doadores vivos, somente 23 coletaram amostra de urina no período pré-transplante e foram incluídos no estudo.

Tabela 10: Características demográficas dos 23 doadores incluídos na coorte. Virúria BKV: presença do BKV na urina dos doadores, analisada por qPCR.

	<i>n</i> = 23	<i>Virúria BKV</i>	<i>p</i>
Sexo			0,28*
<i>Masculino</i>	8 (34,8%)	0 (0%)	
<i>Feminino</i>	15 (65,2%)	4 (26,7%)	
Raça[#]			1,00**
<i>Branca</i>	17 (77,2%)	4 (23,5%)	
<i>Mulata</i>	3 (13,6%)	0 (0%)	
<i>Negra</i>	2 (9,2%)	0 (0%)	
<i>Parda</i>	--	--	
<i>Amarela</i>	--	--	
Idade			0,17***
<i>0-30</i>	5 (21,7%)	0 (0%)	
<i>31-40</i>	8 (34,8%)	1 (12,5%)	
<i>41-50</i>	6 (26,1%)	2 (33,3%)	
<i>51-60</i>	2 (8,7%)	0 (0%)	
<i>Acima de 61</i>	2 (8,7%)	1 (50,0%)	
<i>mediana</i>	35		

[#] Informação disponível apenas para 22 doadores. * Teste exato de Fisher ** Teste exato de Fisher comparando raças "branca" e "não-branca". *** Teste de *t student*

Não houve relação estatisticamente significativa entre a presença do BKV na urina dos 23 doadores e a idade, sexo ou raça dos mesmos.

5.4.3. PROPORÇÃO DE PACIENTES COM VIRURIA E VIREMIA POR BKV NOS DIFERENTES MESES DO PERÍODO PÓS-TRANSPLANTE

Entre os 85 receptores que concluíram o acompanhamento por 12 meses, foi possível analisar por qPCR 904 amostras, das quais 386 (42,7%) apresentaram viruria por BKV. A mediana da carga viral urinária das amostras de urina foi de 16.200 cp/mL ($1.000 - 1,0 \times 10^8$ cp/mL) – tabela 11.

O período com maior positividade de viruria e viremia ocorreu no terceiro mês após o transplante, no qual a porcentagem de receptores virúricos foi de 61,0% (50/82) e virêmicos de 7/82 (8,5%). A mediana da carga viral urinária neste mês foi mais elevada do que em outros períodos.

Já pela técnica de citologia, percebe-se que a positividade pelo BKV, invariavelmente, é menor ao longo do seguimento, quando comparada a qPCR. De um total de 863 amostras testadas, 111 (12,9%) apresentaram resultado positivo, sendo as outras consideradas negativas ou inconclusivas. O período com maior positividade, ao contrário da análise de viruria por qPCR, foi o nono mês pós-transplante.

As medianas da carga viral urinária, medidas por qPCR nas amostras que apresentavam *decoy-cell* positiva, foi superior aos das amostras virúricas em praticamente todos os meses do seguimento.

Tabela 11: Seguimento laboratorial mensal mostrando o número de receptores com amostras de urina e de plasma positivas para a presença do BKV por qPCR.

		Mês de seguimento												
		1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	11º	12º	TOTAL
URINA qPCR	N Receptores	78	73	82	80	71	78	78	81	79	78	71	55	904
	VIRURIA +	28	28	50	37	39	30	35	38	33	28	26	20	386
	%	35,9	38,4	61,0	46,2	54,9	38,4	45,4	46,9	41,7	37,2	36,6	36,4	42,7
	Mediana CV (cp/mL)	26.330	35.550	145.500	71.100	49.050	43.920	141.000	101.200	52.400	42.070	40.400	21.050	16.200
URINA DECOY-CELL	N Receptores	77	76	77	76	78	73	75	79	73	69	61	48	863
	DC +	5	8	12	7	5	11	7	8	12	6	3	4	111
	%	6,4	10,5	15,6	9,2	6,4	15,1	9,3	10,1	16,4	8,7	4,9	8,3	12,9
	Mediana CV (cp/mL)	4.400.000	28.000.000	11.600.000	39.000	3.100.000	25.000	370.000	14.000	68.000	100.000	2.700	2.900	84.000
PLASMA qPCR	N Receptores	78	73	82	80	71	78	78	81	79	78	71	55	904
	VIREMIA +	2	5	7	4	5	4	5	6	5	3	3	1	50
	%	2,6	6,9	8,5	5,0	7,1	5,2	6,4	7,4	6,3	3,9	4,2	1,8	5,5
	Mediana CV (cp/mL)	1.700	25.000	7.930	2.830	3.090	60.800	5.840	3.600	50.600	78.000	13.970	4.900	2.300

CV: mediana da carga viral (cp/mL) calculada por qPCR

* Calculada por qPCR

TOTAL – total de amostras

Os gráfico 1 mostra a evolução da porcentagem de receptores com viruria e viremia analisados por qPCR, ao longo dos 12 meses de seguimento.

Gráfico 1: Gráfico de linhas mostrando a positividade por BKV em amostras de urina (viruria) e de plasma (viremia) dos receptores analisadas por qPCR, ao longo de 12 meses de seguimento.

A figura 5 representa a evolução da viruria e da viremia por BKV nos receptores, mês a mês, ao longo do seguimento laboratorial.

5.4.4. CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA DE KAPLAN-MEIER

Conforme referido anteriormente, foram também traçadas as curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier considerando-se, respectivamente, a viruria e a viremia como desfecho de “doença”.

Os gráficos 2 e 3 mostram as curvas de sobrevivência entre os receptores virúricos e virêmicos considerando-se o primeiro episódio de viruria e viremia apresentados por cada receptor.

Gráfico 2: Curva de Kaplan-Meier demonstrando a sobrevivência acumulada ou probabilidade (1-0) de um receptor não desenvolver viruria ao longo do seguimento. Dias pós-transplante: dias de seguimento laboratorial após o transplante (0-365)

É possível observar através do gráfico anterior que, a partir do terceiro mês pós-transplante (90 dias), mais da metade dos receptores virúricos já

apresentaram ao menos um episódio de virúria por BKV. É possível ainda constatar que mais de 90% dos receptores virúricos apresentou BKV na urina por volta do sétimo mês pós-transplante.

A mediana para o desenvolvimento de virúria após o transplante foi de 62 dias (30 – 212) e a média de 78 dias.

Gráfico 3: Curva de Kaplan-Meier demonstrando a sobrevivência acumulada ou probabilidade (1-0) de um receptor não desenvolver viremia ao longo do seguimento. Dias pós-transplante: dias de seguimento laboratorial após o transplante (0-365)

Apesar do gráfico 3 demonstrar que a viremia é um evento normalmente mais tardio do que a virúria, é possível constatar que mais de metade dos receptores virêmicos apresentou BKV no plasma a partir do centésimo dia do seguimento. É possível ainda constatar que cerca de 80%

dos receptores virêmicos apresentou BKV no sangue por volta do nono mês pós-transplante.

A mediana para o desenvolvimento de viremia após o transplante foi de 92 dias (14 – 364) e a média de 117,5 dias.

Foram também traçadas curvas de Kaplan-Meier considerando-se a presença de viruria entre todos os receptores incluídos no estudo (gráfico 4) e os episódios viremia ocorridos entre os receptores virúricos (gráfico 5).

Para a construção destas curvas foram considerados todos os episódios de viruria e de viremia dos receptores, inclusive os recorrentes.

Gráfico 4: Curva de Kaplan-Meier demonstrando a sobrevivência acumulada ou probabilidade (1-0) de todos os receptores não desenvolverem viruria ao longo do seguimento. Meses pós-transplante: meses de seguimento laboratorial após o transplante (0-12)

Através da análise do gráfico 4 é possível observar que, além da viruria ser um episódio comum entre os receptores, mais da metade destes apresentou viruria até o terceiro mês pós-transplante.

A mediana para o desenvolvimento de viruria após o transplante entre todos os receptores foi de 5 meses (4,5 – 5,6) e a média de 3,3 meses.

Gráfico 5: Curva de Kaplan-Meier demonstrando a sobrevivência acumulada ou probabilidade (1-0) dos receptores virúricos não desenvolverem viremia ao longo do seguimento. Meses pós-transplante: meses de seguimento laboratorial após o transplante (0-12)

Através da análise do gráfico 5 pode-se verificar que, entre os receptores virúricos que evoluíram para viremia, todos o fizeram até o oitavo mês pós-transplante. Também é possível observar que cerca de 65% dos

receptores virúricos não apresentaram BKV no sangue ao longo do seguimento.

A mediana para o desenvolvimento de viremia após o transplante entre os receptores virúricos foi de 9,3 meses (8,3 – 10,2) e a média de 7,4 meses.

5.4.5. DESEMPENHO DA qPCR E DA CITOLOGIA NA DETECÇÃO DE AMOSTRAS COM VIREMIA

Para avaliar desempenho das técnicas de qPCR e citologia na detecção de viremia, as amostras com viremia positiva foram analisadas em relação a proporção de resultados positivos da citologia ou da qPCR nas amostras de urina colhidas no mesmo dia da coleta da viremia. Em relação à citologia, os resultados inconclusivos foram considerados “negativos”, já que se considerou que o teste não permitiu a detecção do vírus na urina (tabela 12).

Entre as 50 amostras virêmicas que apresentavam urina disponível para análise, a citologia apresentou *decoy-cell* positiva em 15/50 (30%), enquanto que a qPCR detectou a presença do BKV na urina de 44/46 (95,7%) das amostras.

Além disso, no quinto mês pós-transplante, nenhuma das cinco amostras com viremia positiva apresentou *decoy-cell* na urina, contra 100% de detecção por qPCR.

Tabela 12: Desempenho entre qPCR e citologia na detecção de viremia, comparando-se o número de urinas positivas por cada técnica. Os resultados de DC inconclusivos foram considerados “negativos”.

	Mês de seguimento												TOTAL
	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	11º	12º	
Número de Virêmicos	2	5	7	4	5	4	5	6	5	3	3	1	50
qPCR positivos	1	2/2 ¹	6	4	5	3/3 ²	5	6	5	3	3	1	44/46
% positivos	50,0	100,0	85,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	95,7
DC positivos	1	2	2	1	0	1	1	2	2	1	1	1	15/50
% positivos	50,0	40,0	28,5	25,0	0,0	25,0	20,0	33,3	40,0	33,3	33,3	100,0	30,0

¹ 3 receptores não realizaram qPCR na urina ² 1 receptor não realizou qPCR

5.4.6. CÁLCULO DA SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E VALOR PREDITIVO PARA DETERMINAÇÃO DE VIREMIA

De modo a avaliar qual o risco de um receptor com urina positiva por BKV apresentar viremia, foram calculadas a sensibilidade, especificidade e os valores preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) de cada técnica considerando-se a viremia como desfecho final ou “doença”.

A tabela 13 refere-se aos resultados de qPCR em urina, a tabela 14 aos resultados de *decoy-cell* que foram conclusivos e a tabela 15 faz a comparação levando em conta todas as amostras de *decoy-cell*, mesmo as inconclusivas, que no caso foram consideradas “negativas”.

Tabela 13: Comparação dos resultados da detecção do BKV por qPCR em amostras pareadas de urina e plasma para cálculo dos valores preditivo positivo e negativo para detecção de viremia.

		VIREMIA		TOTAL
		Presente	Ausente	
qPCR urina	Positivo	44	127	171
	negativo	2	101	103
	TOTAL	46	228	274

A sensibilidade e especificidade da qPCR para determinação de viremia:

$$\text{Sens}_{\text{qPCR}} = 44/46 = 95,7\%$$

$$\text{Espec}_{\text{qPCR}} = 101/228 = 44,3\%$$

Os valores preditivos positivo e negativo para qPCR:

$$VPP_{qPCR} = 44/171 = 25,7\%$$

$$VPN_{qPCR} = 101/103 = 98,0\%$$

Tabela 14: Comparação dos resultados da detecção do BKV por citologia em amostras pareadas de urina e plasma para cálculo dos valores preditivo positivo e negativo para detecção de viremia. Amostras de urina com resultados conclusivos.

		VIREMIA		TOTAL
		Presente	Ausente	
Citologia (conclusivos)	Positivo	14	29	43
	negativo	9	115	124
	TOTAL	23	144	167

A sensibilidade e especificidade da citologia, considerando-se apenas amostras conclusivas, para determinação de viremia:

$$Sens_{citologia\ conc.} = 14/23 = 60,9\%$$

$$Espec_{citologia\ conc.} = 115/144 = 79,9\%$$

Os valores preditivos positivo e negativo:

$$VPP_{citologia\ conc.} = 14/43 = 32,5\%$$

$$VPN_{citologia\ conc.} = 115/124 = 92,7\%$$

Tabela 15: Comparação dos resultados da detecção do BKV por citologia em amostras pareadas de urina e plasma para cálculo dos valores preditivo positivo e negativo para detecção de viremia. Amostras de urina com resultados conclusivos e inconclusivos.

		VIREMIA		
		<i>Presente</i>	<i>Ausente</i>	<i>TOTAL</i>
Citologia (concl + inconc)	<i>Positivo</i>	14	29	43
	<i>Negativo</i>	32	199	231
	<i>TOTAL</i>	46	228	274

A sensibilidade e especificidade da citologia, considerando-se tanto amostras conclusivas quanto inconclusivas, para determinação de viremia:

$$\text{Sens}_{\text{citologia total}} = 14/46 = 30,4\%$$

$$\text{Espec}_{\text{citologia total}} = 199/228 = 87,3\%$$

Os valores preditivos positivo e negativo para citologia:

$$\text{VPP}_{\text{citologia total}} = 14/43 = 32,5\%$$

$$\text{VPN}_{\text{citologia total}} = 199/231 = 86,1\%$$

5.4.7. RELAÇÃO ENTRE EPISÓDIO DE VIRURIA POR BKV E EVOLUÇÃO PARA VIREMIA

Pesquisou-se também se o número de episódios de viruria por BKV na urina nos receptores poderia estar associado ao desenvolvimento de viremia (tabela 16). Para tal, contabilizou-se o número de virurias que precederam à primeira viremia positiva.

Foi possível fazer esta análise em 19 receptores viremicos, já que em dois deles a viremia foi positiva no primeiro mês pós-transplante e em outro não houve a coleta de urina no mês que precedeu a viremia.

Tabela 16: Comparação do número de virúrias positivas anteriores a viremia em receptores virêmicos e respectivas medianas das cargas virais urinárias e plasmáticas por BKV. CV urina: mediana das cargas virais das amostras de urina que antecederam a viremia, em cp/mL. CV plasma: mediana das cargas virais das amostras de plasma positivas, em cp/mL.

Nº de virúrias anteriores a viremia	Receptores (%)	CV urina (cp/mL)	CV plasma (cp/mL)
0	3/19 = 15,8%	---	17.940
1	5/19 = 26,3%	1.480.000	5.563
2	4/19 = 21,1%	30.000	7.230
3	2/19 = 10,5%	3.006.000	350.000
4	2/19 = 10,5%	50.531.800	79.000
5 ou +	3/19 = 15,8%	580.140	59.900

Através da análise dos dados da tabela 16, percebe-se que a mediana da carga viral plasmática foi maior em receptores que tiveram um maior número de episódios de excreção do BKV que precederam a viremia.

Além disso, em 15,8% dos receptores, ocorreu viremia sem a excreção do BKV na urina nos meses anteriores. A mediana da carga viral plasmática destes receptores foi de 17.940 cp/mL.

5.4.8. AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA EXCREÇÃO DO BKV PELOS RECEPTORES NO PERÍODO PRÉ-TRANSPLANTE

De modo a se avaliar se a excreção de BKV pelos receptores previamente ao transplante influenciaria o desenvolvimento de virúria e viremia no período pós-transplante, estes foram divididos em dois grupos – aqueles cuja amostra pré-transplante de urina foi positiva para a presença do vírus (n=11) e outro constituído por receptores que não excretavam o BKV antes do transplante (n=24).

Entre os 85 receptores, 43 (50,6%) eram anúricos no período pré-transplante e 7 (8,2%) não coletaram urina e portanto, apenas 35 receptores foram incluídos nesta análise.

As tabelas 17 e 18 comparam, respectivamente, a presença ou ausência do BKV no período pré-transplante para o desenvolvimento de virúria e viremia.

Tabela 17: Tabela de dupla entrada comparando a excreção do BKV em urina (virúria) no período pré-transplante ao desenvolvimento de virúria no período pós-transplante. $p=0,09$ (teste exato de Fisher). * Presença de ao menos uma amostra positiva.

		Virúria pós-transplante*		TOTAL
		Presente	Ausente	
Virúria pré-transplante	Positivo	9	2	11
	negativo	24	0	24
TOTAL		33	2	35

Todos os receptores que não excretavam o BKV anteriormente ao transplante acabaram por apresentar viruria, ao menos uma vez, em algum momento do período pós-transplante.

A mediana da carga viral urinária nos receptores excretadores e não-excretadores foi, respectivamente, de 43.250 cp/mL e 30.300 cp/mL.

Não se verificou uma relação estatisticamente significativa entre a ausência de viruria no período pré-transplante e a evolução para viruria no pós-transplante.

Tabela 18: Tabela de dupla entrada comparando a excreção do BKV em urina (viruria) no período pré-transplante ao desenvolvimento de viremia no período pós-transplante. $p=1,00$ (teste exato de Fisher). * Presença de pelo menos uma amostra positiva.

		Viremia pós-transplante*		TOTAL
		Presente	Ausente	
Viruria pré-transplante	Positivo	4	7	11
	negativo	4	20	24
TOTAL		8	27	35

Quando analisada a evolução para viremia entre os dois grupos, percebe-se que houve uma maior porcentagem de receptores com excreção positiva por BKV no pré-transplante que evoluiu para viremia, quando comparado ao grupo não-excretor.

A mediana da carga viral plasmática nos receptores excretadores e não-excretor foi, respectivamente, de 3.100 cp/mL e 25.000 cp/mL.

Entretanto, não houve relação estatisticamente significativa entre a presença de viruria no pré-transplante e a evolução para viremia.

5.4.9. AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA VIRURIA DO DOADOR NA EXCREÇÃO DO BKV PELOS RECEPTORES

De modo a avaliar se presença do BKV na urina dos doadores influenciaria a evolução para viruria e viremia entre os receptores no período pós-transplante, os últimos foram divididos em dois grupos – aqueles que receberam transplante de doadores com viruria (n=4) ou sem viruria (n=19).

As tabelas 19 e 20 comparam, respectivamente, a evolução para viruria e viremia dos receptores que receberam rim de doador virúrico ou não-virúrico.

Tabela 19: Tabela de dupla entrada comparando a evolução para viruria dos receptores no período pós-transplante que receberam rim de doadores excretadores ou não-excretadores de BKV. $p=1,00$ (teste exato de Fisher). * Presença de ao menos uma amostra positiva.

		Viruria pós-tranplante receptor		TOTAL
		Presente	Ausente	
Viruria pré-transplante do doador	Positivo	2	2	4
	negativo	12	7	19
TOTAL		14	9	23

Não houve relação estatisticamente significativa entre a presença de viruria no doador no período pré-transplante e a evolução para viruria nos receptores.

A mediana da carga viral urinária nos receptores oriundos de doadores excretadores e não-excretadores foi, respectivamente, de 22.100 cp/mL e 117.000 cp/mL.

Tabela 20: Tabela de dupla entrada comparando a evolução para viremia dos receptores no período pós-transplante que receberam rim de doadores excretadores ou não-excretadores de BKV. $p=0,90$ (teste exato de Fisher). * Presença de pelo menos uma amostra positiva.

		Viremia pós-transplante do receptor		TOTAL
		Presente	Ausente	
Viruria pré-transplante do doador	Positivo	1	3	4
	negativo	5	14	19
	TOTAL	6	17	23

Tambem não houve relação estatisticamente significativa entre a presença de viruria no doador no período pré-transplante e a evolução para viremia nos receptores.

A mediana da carga viral plasmática nos receptores oriundos de doadores excretadores e não-excretadores foi, respectivamente, de 5.500 cp/mL e 3.400 cp/mL.

5.5. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO POLIOMAVÍRUS BK

5.5.1. DETERMINAÇÃO DOS SUBTIPOS DO BKV EM AMOSTRAS DE DOADORES E RECEPTORES DE TRANSPLANTE RENAL

Foi possível determinar os subtipos/genótipos e os subgrupos do BKV em 46 amostras de receptores e em 3 amostras de urina de doadores pertencentes a coorte. Esta análise molecular foi realizada a partir de um fragmento de 241 nucleotídeos, que permitiu genotipar o BKV das respectivas amostras de receptores e doadores da coorte bem como construir uma árvore filogenética. Nesta árvore, foram também incluídas sequências oriundas de amostras de onze pares “doador-receptor”, contendo a sequência maior do gene VP1, de 549 nucleotídeos, além das sequências de referência dos genótipos obtidas no GenBank (figura 6).

Através da reconstrução filogenética dos BKV da urina dos indivíduos da coorte, foi identificado que um receptor apresentava genótipo III (2,2%), outro o genótipo IV (2,2%) e que a maioria, 44/46 receptores (95,6%), apresentava o genótipo I. Todos os doadores da coorte apresentaram amostras pertencentes ao genótipo I. Entre os receptores que possuíam o genótipo I, foi possível ainda classificá-los nos respectivos subgrupos Ia, Ib-1, Ib-2 e Ic. A maioria dos receptores (39/44, 88,6%) possuía subgrupo Ia do BKV enquanto que somente dois (11,4%) apresentaram o subgrupo Ib1. Em três amostras, identificadas como “Pac 20”, “Pac 23” e “Pac 30”, não foi possível determinar o subgrupo do BKV, embora seja possível afirmar que os mesmos pertencem ao genótipo I. Nenhum receptor apresentou os subgrupos Ib2 ou Ic nem o genótipo II.

Figura 6: Árvore filogenética contendo seqüências do gene da VP1 do BKV de amostras de urina de receptores e doadores da coorte e dos pares “doador-receptor”. Pac – receptor da coorte. Don: doador da coorte. R: receptor do par “doador-receptor”. D: doador do par “doador-receptor”. As seqüências de referência estão identificadas com o número de acesso do GeneBank.

5.5.2. IDENTIFICAÇÃO E COMPARAÇÃO DE REARRANJOS MOLECULARES NO GENE VP1 DO BKV EM AMOSTRAS DE URINA DE DOADORES E RECEPTORES DE TRANSPLANTE RENAL

Ao todo, foi possível selecionar 11 pares “doador-receptor”, ou seja, a amostra de urina do doador foi positiva para a presença do BKV e o respectivo receptor apresentou ao menos uma amostra de urina positiva, ambas amplificadas e sequenciadas para análise do segmento maior do gene da VP1 do BKV.

De acordo com a árvore filogenética (figura 6), pode-se verificar que em três dos onze pares, houve importantes diferenças quando comparadas as sequências entre as amostras do doador e receptor.

Em um dos pares, tal diferença foi marcante, já que o doador “D9” apresentava o genótipo IV enquanto que o respectivo receptor, denominado “R9”, possuía em sua amostra de urina BKV com subtipo Ia.

O segundo par, identificado por “D3” e “R3”, embora de acordo com a árvore pertençam ao mesmo subgrupo Ia, apresentam uma distância genética significativa. Além disso, as inspeções visuais realizadas no par de sequências evidenciaram cinco substituições de nucleotídeos entre si. Três delas resultaram em mutações não-sinônimas, ou seja, tal alteração implicou na mudança do aminoácido correspondente. O mesmo ocorreu no par doador-receptor “D2-R2”, no qual duas substituições em suas respectivas sequências levaram a alteração de dois aminoácidos (tabela 21). Apesar de estes dois pares pertencerem ao mesmo genótipo, conforme referido, às diferenças entre as sequências genéticas dos mesmos foram significativas.

Tabela 21: Identificação, posições e substituições de nucleotídeos e aminoácidos entre a sequência de doadores e receptores dos pares D3/R3 e D2/R2. Posição relativa ao tamanho do fragmento do gene da VP1 sequenciado.

<i>Par</i>	<i>Posição</i>	<i>Nucleotídeo</i>	<i>Aminoácido</i>
D3/R3	6	Citosina → Guanina	Alanina → Glutamato
	11	Adenina → Guanina	--
	34	Citosina → Guanina	--
	203	Adenina → Timina	Asparagina → Histidina
	320	Adenina → Guanina	Isoleucina → Valina
D2/R2	135	Citosina → Timina	Alanina → Valina
	320	Guanina → Adenina	Valina → Isoleucina

Ainda de acordo com a árvore representada na figura 6, é possível notar que outros pares ‘doador-receptor’ também não foram idênticos, como D10-R10 e D5-R5, por exemplo. Entretanto, a curta distância genética entre eles, bem como o caráter sinônimo das substituições que os diferem, não permitiram concluir a origem dos mesmos.

Os demais pares mostraram sequências de BKV idênticas entre a urina do doador e receptor. Quando analisadas as sequências “inter-receptores”, ou seja, analisando somente as sequências oriundas dos receptores, pôde-se verificar que estas eram semelhantes entre si.

5.5.3. IDENTIFICAÇÃO E COMPARAÇÃO DE REARRANJOS MOLECULARES NO GENE NCCR DO BKV EM AMOSTRAS DE URINA E PLASMA DE RECEPTORES DE TRANSPLANTE RENAL

Foi possível sequenciar e analisar a região NCCR do BKV em 9 “tripletos” de amostras. Tais “tripletos” continham duas amostras de urina, uma anterior e outra concomitante ao momento da viremia, bem como a amostra de plasma positiva para o BKV.

A grande maioria dos “tripletos” - 8/9 (88,9%) - não apresentou nenhuma diferença genética na região NCCR entre as respectivas sequências, sendo todos considerados BKV do tipo arquétipico, ou seja, não apresentavam vírus rearranjados.

Por outro lado, de acordo com o alinhamento das sequências consenso obtidas de cada um dos fragmentos, um dos “tripletos” mostrou uma deleção de 26 nucleotídeos na junção dos blocos Q e R, se iniciando na posição 131, afetando a região do segundo *enhancer* na sequência obtida do plasma (figura 7). Embora essa deleção não corresponda a um rearranjo ‘classico’, ou seja, com duplicações e inserções ao longo de toda a sequência, o vírus foi classificado como rearranjado. Interessantemente, uma análise mais detalhada dos cromatogramas gerados a partir das urinas e plasma, mostrou que a amostra de urina concomitante a viremia (U2) apresentava duas populações distintas de vírus, uma arquetípica (sem a deleção) e outra rearranjada (com a deleção).

Este “triplete” foi identificado nas amostras do receptor que desenvolveu o maior número de viremias consecutivas ao longo do acompanhamento – seis episódios de viremia seguidos.

Não foi possível estabelecer relação entre o aumento da carga viral e o aparecimento de formas rearranjadas do vírus na urina e/ou plasma.

Figura 7: Alinhamento múltiplo das sequências genéticas da região da NCCR do BKV das amostras do receptor com rearranjo. Urine_pre: amostra de urina anterior à data de viremia. Urine: amostra de urina coletada no mesmo dia da amostra virêmica. Plasma: amostra de plasma com viremia. Δ 131: Deleção na posição 131. Blocos Q, R e S descritos por Moens *et al*, 1995. Posições dos nucleotídeos de acordo com a referencia do Genbank AB263938

6) DISCUSSÃO

Este trabalho iniciou-se pela otimização de uma PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para detecção de BKV na urina e no plasma de doadores e receptores de transplante renal. Diversos estudos mostram a importância da detecção e quantificação dos poliomavírus em urina e em plasma como fatores de risco de evolução para nefrite intersticial – BKVN (Brennan *et al*, 2005; Hirsch *et al*, 2002).

Antes da realização do presente estudo, os resultados do diagnóstico laboratorial de poliomavírus realizado no Laboratório de Virologia enviados à Unidade de Transplante Renal do HC-FMUSP eram qualitativos, ou seja, não determinavam a quantidade de cópias virais presentes em amostras de urina e de plasma. Desta forma, o desenvolvimento do teste quantitativo foi de grande valia, já que de acordo com recomendações internacionais (Hirsch *et al*, 2005A), amostras de pacientes submetidos a transplante renal que apresentarem cargas virais superiores a 10^7 cópias/mL em urina e 10^4 cópias/mL em plasma podem ser indicativas de nefropatias, propiciando acompanhamento clínico e laboratorial mais cuidadoso do paciente.

Os dados de mediana das cargas virais urinárias e plasmáticas obtidas ao longo do seguimento revelam que o limite recomendado para presença do BKV no plasma foi ultrapassado em praticamente todos os meses, sugerindo que certos receptores da coorte estiveram em risco de desenvolver BKVN e, além disso, reforçam a importância da implementação do diagnóstico quantitativo na rotina do HC-FMUSP.

Cabe incluir nesta discussão os critérios adotados para determinação do valor de *cut-off* da técnica de qPCR para quantificação do BKV.

Conforme descrito anteriormente, o limite de detecção da qPCR foi de aproximadamente 1.000 cópias/mL, ou seja, amostras que possuísem carga viral abaixo deste limite foram consideradas “indetectáveis”, já que a reprodutibilidade do diagnóstico nestes casos não poderia ser garantida, primando-se pela qualidade do mesmo. Este valor de sensibilidade analítica do teste está próximo ao descrito em outros estudos (Krumbholz et al, 2006; Pal et al, 2006; Viscount et al, 2007). Randhawa et al (2005b) sugere, de fato, que o limite de detecção da PCR quantitativa deva estar entre 100 e 1.000 cópias/mL.

Entretanto, diversos resultados apresentaram valores de carga viral próximos deste limiar, o que mostra que se tais amostras fossem consideradas positivas, a incidência do BKV na coorte poderia ter sido superior a apresentada.

Considera-se ainda que a otimização da técnica de qPCR foi importante já que estas não estão disponíveis comercialmente, reforçando a necessidade de padronização de testes “*in-house*” e sua validação em estudos prospectivos.

O número limitado de receptores incluídos na presente casuística associado à baixa incidência de BKVN no período pós-transplante, impediu que o qPCR otimizado pudesse ser avaliado em relação ao diagnóstico desta nefropatia. Contudo, pudemos avaliar o desempenho da qPCR em

relação a detecção de *decoy-cell* na urina, que ainda é a técnica utilizada na rotina da maioria dos centros de transplante renal no Brasil.

A detecção molecular dos poliomavírus tem sido considerada como “padrão-ouro” no acompanhamento dos receptores, e a sua eficácia comprovada por diversos estudos (Nickeleit *et al*, 1999; Hirsch *et al*, 2002; Randhawa *et al*, 2005B; Duclos *et al*, 2006).

Atualmente, mesmo com uma enorme variedade de técnicas moleculares disponíveis, a PCR quantitativa com a determinação da carga viral é o método que possui maior sensibilidade e especificidade para detecção do BKV. A presença de inclusões virais ou *decoy-cell*, considerada a técnica com maior valor preditivo negativo (Boldorini *et al*, 2005B; Hirsch *et al*, 2002) tem sido substituída pela PCR quantitativa. A avaliação de qual das duas técnicas é a mais adequada para prevenção precoce de BKVN permanece controversa.

Desta forma, uma das propostas do presente estudo foi a comparar a correlação existente entre as técnicas de qPCR e citologia para o diagnóstico dos poliomavírus em urina, através do cálculo do índice *Kappa*.

De modo a avaliar o impacto e o “real” diagnóstico da *decoy-cell*, os resultados de citologia foram divididos em dois grupos: um que incluiu somente os resultados conclusivos e outro contendo tanto amostras conclusivas quanto inconclusivas, e estes foram comparados aos resultados da qPCR. Os valores do índice *kappa* da correlação entre a técnica de citologia e a qPCR mostraram que esta foi, respectivamente, fraca e pobre.

Esta baixa correlação está associada as importantes diferenças na sensibilidade e especificidade dos dois métodos.

De fato, um dado que chamou a atenção foi o excessivo número de amostras de urina (43%) com detecção considerada “inconclusiva” pela técnica citológica. As causas que levaram a este elevado número de amostras “inconclusivas” não são conhecidas, mas acredita-se que possam estar associadas ao tempo de execução da técnica, já que as decoy-cell devem ser processadas em um intervalo máximo de três horas, ou ainda à subjetividade da análise do técnico.

Na prática, este número elevado de amostras inconclusivas tornou o monitoramento por BKV impreciso e prejudicou o acompanhamento laboratorial e clínico do paciente, já que eventualmente não houve solicitação de coleta de sangue para pesquisa de viremia.

Ao longo do seguimento laboratorial, os resultados obtidos confirmaram que a técnica de qPCR foi mais sensível para detecção do BKV em amostras de urina. Entre as 904 amostras de urina testadas por qPCR, 42,7% apresentaram viruria, enquanto que pela citologia apenas 12,9% (111/863) apresentaram detecção por *decoy-cell*.

Esta maior sensibilidade da qPCR em relação à *decoy-cell* bem como a baixa correlação entre as técnicas observadas no presente estudo, foram também confirmadas por outros estudos.

Randhawa *et al* (2005B), ao compararem as duas técnicas, verificaram uma maior sensibilidade e especificidade da PCR quantitativa face a citologia na detecção de BKV na urina de receptores submetidos a

transplante renal. Entre as amostras de urina testadas, a PCR quantitativa detectou mais 18% de amostras de viruria do que a citologia por *decoy-cell*. Koukoulaki *et al* (2008) confirmaram que existe uma baixa correlação entre a técnica molecular e a citologia.

Em nosso estudo, o período com maior positividade de BKV na urina dos receptores no período pós-transplante diferiu quando analisado por cada técnica: terceiro mês por qPCR e nono mês por citologia.

Esta informação pode ser particularmente importante já que, nestes meses, teoricamente, a possibilidade de uma reativação e consequente desenvolvimento de viremia pelos receptores deve ser maior do que em outros períodos.

Outro dado relevante obtido da análise do seguimento laboratorial foi a comparação da carga viral urinária entre amostras positivas detectadas por cada técnica. A mediana da carga viral em urina das amostras positivas por citologia foi, na maioria dos meses de acompanhamento, muito superior à mediana da carga viral das virurias. Estes resultados parecem sugerir que a técnica citológica requer um número maior de cópias virais nas amostras de urina para ser passível de detecção e, possivelmente, pode falhar na detecção do BKV em amostras com cargas virais baixas, evidenciando a sua baixa sensibilidade quando comparada a qPCR.

A nosso ver, a utilização da citologia para detecção do BKV em urina apresenta três consideráveis desvantagens: o número elevado de amostras com resultados “inconclusivos”, a impossibilidade de se quantificar as amostras e a ao fato de que os anticorpos do poliomavírus SV40 utilizados

nesta técnica detectam tanto a presença de *decoy-cells* oriundas de BKV quanto de JVC, impedindo o diagnóstico diferencial entre os dois vírus.

Nossos resultados também mostraram que em 95,7% das amostras virêmicas detectou-se BKV por qPCR em amostra de urina colhida concomitantemente, enquanto somente 30% das amostras virêmicas foram acompanhadas por detecção de *decoy-cell* na urina.

A sensibilidade da técnica citológica para detecção de viremia foi muito baixa, variando de 30,4% caso considerem-se amostras inconclusivas como negativas a 60,9%, se considerarmos somente as amostras conclusivas. Por outro lado, a sensibilidade da qPCR foi alta (95,7%). Quando avaliamos a especificidade entre as técnicas, sempre em relação à viremia, observamos que a técnica citológica apresentou especificidade bem superior, variando de 79,9% a 87,3%, enquanto a qPCR apresentou especificidade de apenas 44,3%.

Contudo, o que chama a atenção em relação a estes dois testes é o baixo valor preditivo positivo (VPP) de ambos para detecção de viremia pelo BKV, que é o evento mais relevante quanto ao risco potencial de BKVN: 32,5% para a pesquisa de *decoy-cell* e 25,7% para a qPCR. Estes resultados levam inevitavelmente à uma pergunta: será justificável fazer triagem mensal para detecção de BKV na urina de receptores de transplante renal com valores preditivos positivos tão baixos, que independem da técnica utilizada?

Diante disso, parece-nos pertinente sugerir que o acompanhamento dos receptores deva ser efetuado somente com a qPCR para determinação

de viremia. De fato, a curva de Kaplan-Meier mostrou que a virúria por BKV é um evento extremamente comum entre os receptores, o que acarreta o baixo valor preditivo positivo desta técnica para detecção de viremia.

Observando a incidência de viremia ao longo do seguimento, percebe-se que embora haja um “pico” na positividade de receptores com BKV aos 90 dias, a viremia pode ocorrer a qualquer momento do período de um ano após o transplante.

Logo, de modo a garantir que todos os pacientes virêmicos possam ser monitorados, uma possibilidade seria a de fazer uma vigilância mensal por qPCR no plasma, especialmente nos primeiros oito meses pós-transplante, já que a curva de Kaplan-Meier (gráfico 5) mostrou que todos os receptores virúricos evoluíram para viremia até esta data. Além disso, é importante salientar que 15% dos receptores com viremia não foram antecidos por virúria no qPCR, que é a técnica mais sensível. Cabe ainda ressaltar que a mediana da carga viral destes pacientes foi de 17.940 cp/mL, superior ao *cut-off* recomendado internacionalmente para desenvolvimento de BKVN (Hirsch *et al*, 2005A). Isto coloca estes pacientes em risco de desenvolverem nefropatia, já que intervenções terapêuticas precoces deixaram de ser realizadas.

De fato, alguns autores propõem que o monitoramento das amostras de receptores de transplante renal deva ser realizado somente por viremia.

Almeras *et al* (2011), em estudo prospectivo, avaliaram se o monitoramento por viremia e a imediata redução da imunossupressão diminuem a evolução para BKVN. Analisando amostras de 119 receptores,

os autores encontraram DNA do BKV em plasma em 10,9% dos mesmos. A determinação do DNA plasmático precocemente e a consequente redução da imunossupressão fez diminuir a viremia para cargas virais indetectáveis em 11 pacientes. Entre os outros dois receptores virêmicos, a carga viral plasmática permaneceu baixa em um e elevada no outro, que acabou evoluindo para BKVN. No entanto, o monitoramento exclusivo por viremia evitou o desenvolvimento de BKVN, nos primeiros 6 meses pós-transplante, em praticamente todos os receptores (Almeras *et al* 2011).

Ao monitorarem a presença do BKV no sangue de receptores de rim em intervalos de tempo de 1, 2, 3, 6, 9 e 12 meses, Renoult *et al* (2010) mostraram que 22% dos receptores apresentaram viremia durante o primeiro ano pós-transplante e que em 7% destes a viremia permaneceu positiva em média, por 92 dias. Os receptores que apresentavam viremia por dois ou mais meses consecutivos eram sujeitos a uma redução da imunossupressão. Tal situação ocorreu em 6/7 receptores, que após esta intervenção não apresentaram mais BKV detectável no plasma no décimo segundo mês pós-transplante.

Apesar da possibilidade sugerida do acompanhamento ser realizado somente por viremia, estudos envolvendo um maior número de receptores e que incluam ainda o diagnóstico clínico da doença e a variação de imunossupressão devem ser conduzidos para maior esclarecimento de tais dados.

Por fim, cabe ressaltar que a presente casuística não permitiu o cálculo dos VPP e VPN para o desenvolvimento de BKVN. A viremia é

considerado o evento mais importante para o desenvolvimento de BKVN (Hirsch *et al*, 2002; Funk *et al*, 2006; Hymes *et al*, 2006), já que esta nefropatia, na maioria das vezes, ocorre na vigência de viremia pelo BKV. Todavia, tendo em vista que somente uma parcela dos pacientes com viremia pelo BKV evoluirá para BKVN, o VPP da presença do BKV na urina para esta nefropatia deve ser ainda menor.

Os estudos envolvendo o poliomavírus BK no Brasil ainda são escassos e não apontam a incidência do vírus em receptores de transplante renal em nosso meio.

Entre os receptores acompanhados ao longo de um ano no presente estudo, 91,8% apresentaram virúria e 25,9% apresentaram viremia em algum momento do seguimento.

A densidade de incidência do poliomavírus BK entre os receptores de transplante renal, detectada na urina por qPCR, foi de 8,1 casos de virúria por 100 receptores/mês. Já entre os receptores virúricos, a densidade de incidência de viremia foi de 3,5 casos observados por cada 100 receptores/mês.

Em estudo realizado no sul do Brasil, Montagner *et al* (2010) recorrendo a técnica de “semi-nested” PCR, determinaram a prevalência do BKV em amostras de urina e plasma de receptores de transplante renal. Entre os 120 receptores, 25,0 % apresentaram *decoy-cell*, 61,7% virúria e 42,5% viremia.

Outro estudo realizado no Brasil, elaborado por Maia *et al* (2011), calculou a prevalência de *decoy-cell* na urina de receptores renais. Entre os

50 receptores estudados, 24% apresentou citologia positiva no período de acompanhamento, que variou de um a dois anos.

No exterior, diversos estudos prospectivos pesquisaram a incidência do poliomavírus BK em receptores de transplante renal.

Hirsch *et al* (2002), em estudo que incluiu o acompanhamento de 78 receptores na Suíça, determinaram que a incidência do BKV por *decoy-cell* foi de 30%, enquanto que a incidência de viremia, determinada por PCR quantitativo, foi de 13%.

Por sua vez, Almeras *et al* (2008) determinaram que a incidência de virúria e viremia em uma coorte de 123 receptores franceses, na qual o *screening* das amostras também foi realizado por PCR quantitativa, foi de 48,8% e 10,5%, respectivamente.

Huang *et al* (2010), ao avaliarem durante um ano a presença do BKV em amostras de urina e plasma de 90 receptores chineses, obtiveram resultados semelhantes aos estudos anteriormente citados. A incidência do BKV por *decoy-cell*, virúria e viremia neste estudo foi, respectivamente, de 42,2%, 45,6% e 22,2%.

Os dados apresentados, tanto no Brasil quanto no exterior, estão de certa forma corroborando os dados de incidência encontrados no presente estudo, pois mostram que o BKV está frequentemente presente na urina e no plasma dos receptores de transplante renal.

Entretanto é importante ressaltar que o valor de incidência de viremia apresentado pode estar subestimado, já que as amostras de sangue só eram solicitadas caso o receptor apresentasse *decoy-cell* ou virúria positiva

no mês anterior. Embora a maioria absoluta dos receptores viremicos apresentasse qPCR positivo na urina, antecedendo ou concomitante a viremia, alguns pacientes viremicos do nosso estudo não apresentaram viruria por esta técnica – mais sensível para detecção da viruria – levantando a possibilidade de que alguns pacientes podem evoluir para viremia com viruria indetectável na urina.

Outros objetivos do presente estudo foram os de determinar se existe relação entre a excreção de BKV na urina do receptor no período pré-transplante e a evolução para viruria e viremia no pós-transplante bem como se doadores excretadores virúricos influenciam a dinâmica de excreção dos receptores ao longo do seguimento.

Apesar de não ter ocorrido relação estatisticamente significativa entre a viruria positiva no pré-transplante e o aparecimento de BKV na urina e plasma dos receptores ao longo do acompanhamento, observou-se que 100% dos receptores que não excretavam o vírus antes do transplante acabaram por desenvolver ao menos um episódio de viruria em algum momento. Estes dados podem ser um indício de que a prévia excreção do BKV ao transplante possa conferir uma imunidade, embora estudos que incluam técnicas sorológicas devam ser conduzidos para confirmar tal hipótese.

O verdadeiro papel do doador na evolução para viruria e viremia pelo BKV em receptores de transplante renal ainda não foi totalmente elucidado.

Os resultados de um estudo prospectivo elaborado por Bohl *et al* (2005) indicaram que a maioria dos receptores que desenvolveram infecção

por BKV receberam rim de doadores soropositivos. O aparecimento de viruria em receptores de rim de doadores soronegativos foi tardio quando comparado a aqueles que receberam rim de doadores soropositivos.

Thakur *et al* (2012), ao analisarem por PCR amostras de plasma de doadores e receptores no momento do transplante, na Índia, concluíram que quando ambos apresentam viremia positiva por BKV, o risco de desenvolvimento de BKVN é superior.

Em nosso estudo, além de nenhum dos doadores terem viremia por BKV, não houve relação entre a presença do vírus na urina dos doadores e o desenvolvimento de viruria e viremia pelos receptores.

Através da caracterização molecular das amostras de BKV, pudemos não só determinar a prevalência dos genótipos circulantes nesta população no Brasil como também comparar geneticamente a região da VP1 do BKV de amostras dos doadores e receptores, além de avaliar se havia alguma associação entre a evolução para viremia e mutações na região regulatória do vírus.

No presente estudo, a maioria dos receptores apresentava infecção pelo subtipo ou genótipo I do BKV, o mesmo ocorrendo entre os doadores. Chamou-nos a atenção o fato de termos encontrado um receptor com genótipo III, considerado por muitos autores como raro (Takasaka *et al*, 2004; Zheng *et al*, 2007) e outro com genótipo IV, de prevalência baixa e apenas encontrado em receptores da Europa e Ásia (Ikegaya *et al*, 2006).

Nossos achados estão concordantes na prevalência dos diferentes genótipos ao único trabalho descrito no Brasil, pois enquanto 88,6% de

nossos receptores apresentaram amostras pertencentes ao genótipo I, Zalona *et al* (2011), ao sequenciarem a região VP1 de vírus encontrados em amostras de urina em receptores de transplantes renais do Rio de Janeiro encontraram prevalência do genótipo I em 96% dos pacientes, sendo os restantes 4% do genótipo II. Contudo, naquele estudo, não houve nenhum receptor que possuísse genótipos III e IV. Além disso, quando foram subdivididas as amostras dos receptores com genótipo I, a prevalência do subgrupo Ia (29%) foi inferior a do subgrupo Ib-1 (67%), o que também contradiz os nossos dados, onde houve predomínio do subgrupo Ia.

Também está por ser elucidada se a infecção por BKV nos receptores é oriunda do doador ou da própria reativação do vírus após o transplante renal.

A maioria dos estudos realizados sugere fortemente que a fonte de infecção por BKV seria o doador.

Bohl *et al* (2005) sequenciaram amostras de urina e plasma de pares de receptores que receberam rim de cadáver do mesmo doador. Analisando fragmentos dos genes da VP1 e NCCR do BKV, os autores confirmaram que os dois receptores que receberam rim do mesmo doador apresentaram vírus do mesmo genótipo e com sequências genéticas idênticas, reforçando que a origem da infecção por BKV provem do doador.

Estudando quatro pares “doador-receptor” que apresentaram amostras positivas para o BKV, através de análise de fragmentos do gene TCR, Vera-Sampere *et al* (2006) obtiveram resultados semelhantes ao

estudo anterior, já que todas as cepas do poliomavírus BK eram idênticas entre os respectivos pares.

Em nosso estudo ocorreram mutações sinônimas entre algumas sequências do BKV dos pares “doador-receptor” analisadas.

É importante referir que entre algumas sequências do BKV dos pares “doador-receptor” analisados ocorreram mutações sinônimas. Porém, mesmo o BKV tendo elevada conservação genética, o fato de esses pacientes excretarem vírus de maneira prolongada, e em alguns casos, com altas cargas virais, provavelmente fizeram com que algumas mutações ocorressem e fossem amostradas no processo de sequenciamento. Assim, decidiu-se estabelecer como indeterminados aqueles pares que possuíam apenas uma mutação sinônima como divergência.

Contudo, três dos onze pares “doador-receptor” apresentaram sequências genéticas do BKV diferentes entre si, especialmente em um dos casos, no qual a sequência do doador e do receptor divergiam inclusive no genótipo. Tal resultado sugere que a origem da infecção do BKV nos receptores não é exclusivamente oriunda do doador, embora nos outros oito pares as sequências genéticas dos vírus foram idênticas entre si.

Entretanto, julgamos que este achado por si só não comprova que a origem do vírus seja o doador, pois comparando as populações de receptores e de doadores entre si, percebe-se que a grande maioria apresenta sequências genéticas idênticas. Tal dado impossibilita associar tal identidade à infecção pelo doador, já que não se sabe se as cepas são

idênticas porque, de fato, foram transmitidas pelo doador ou se a circulação das mesmas é comum em toda a população.

Por fim, a caracterização molecular levada a cabo neste estudo incluiu a análise da região NCCR do BKV, de modo a verificar se os rearranjos nesta região do vírus estariam associados a uma maior carga viral ou se eventuais cepas rearranjadas são mais frequentes na urina ou no sangue dos receptores que evoluíram para viremia.

Em apenas um dos “tripleto” foi possível constatar, através da análise das sequências consenso, e também dos cromatogramas do sequenciamento, que a urina que antecedeu a viruria apresentava uma população arquetípica, que a urina concomitante a viremia possuía mistura, ou seja, duas populações – uma arquetípica e outra rearranjada – e ainda que, a amostra de plasma, apresentava somente vírus rearranjados.

Tal dado pode sugerir uma possível associação entre a presença de formas rearranjadas do BKV no sangue e a persistência de viremia, já que este “tripleto” de amostras pertencia ao receptor que apresentou, ao longo do seguimento da coorte, o maior número de episódios consecutivos de viremia. Entretanto, não foi possível associar a presença de formas rearranjadas do BKV ao aumento da carga viral ou a um maior risco de viremia.

Estes dados não confirmaram os dados de Gosert et al (2008) que, em estudo prospectivo que incluiu 733 amostras de plasma de 227 receptores, mostraram que a presença de formas rearranjadas da região NCCR do BKV no plasma estão associadas a um aumento de até 20 vezes

na carga viral do vírus, quando comparadas a formas arquetípicas. Contudo, a exemplo do nosso caso, aqueles autores documentaram uma maior persistência da viremia nas formas rearranjadas.

Como consideração final do presente trabalho, deve referir-se que apesar dos dados apresentados terem trazido dados novos sobre a incidência e caracterização molecular do BKV em receptores de transplante renal no Brasil, outros estudos que incluam a análise sorológica, imunossupressão e dados clínicos devem ser elaborados para sustentar tais resultados.

7) CONCLUSÕES

7) Conclusões

- Entre os receptores incluídos na coorte, 91,8% apresentaram virúria e 25,9% apresentaram viremia em algum momento do seguimento.
- A densidade de incidência do poliomavírus BK em receptores submetidos a transplante renal no HC-FMUSP foi de 8,1 casos de virúria por 100 receptores/mês e, entre os receptores virúricos, a densidade de incidência de viremia foi de 3,5 casos observados por cada 100 receptores/mês.
- A otimização da técnica de qPCR permitiu quantificar as cargas virais urinária e plasmática do BKV das amostras oriundas de receptores de transplante renal, mostrando boa sensibilidade e especificidade.
- A comparação entre as técnicas de qPCR e citologia para detecção do BKV em urina apresentou uma correlação pobre.
- Apesar de a qPCR ser mais sensível do que a citologia para monitorização da viremia pelo BKV, o valor preditivo positivo de ambas as técnicas foi baixo.
- A distribuição dos genótipos do BKV entre os receptores em nosso meio mostrou predomínio absoluto do genótipo I, em sua maioria pertencentes ao

subgrupo Ia, estando de acordo ao observado em outro estudo no Brasil. Foram identificados os genótipos III e IV, considerados raros no exterior.

- A análise de sequências do gene da VP1 do BKV de amostras de urina entre pares “doador-receptor” sugere que a origem da infecção pelo vírus não é exclusiva do doador, podendo estar relacionadas à reativação de vírus do próprio receptor.

- A análise de sequências do gene da NCCR do BKV de urina e plasma dos receptores da coorte mostrou predomínio das formas arquetípicas no sangue, sugerindo que formas rearranjadas do vírus não são condição para evolução para viremia.

8) REFERÊNCIAS

8) REFERÊNCIAS

Agha I, Brennan DC. BK virus and current immunosuppressive therapy. *Graft* 2002; 5:S65.

Agostini HT, Jobes DV, Stoner GL. Molecular evolution and epidemiology of JC virus. *In*: Khalili K, Stoner GL, editors. Human polyomaviruses: molecular and clinical perspectives, por K. Khalili e GL Stoner. New York: Wiley; 2001. p. 491-526.

Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, Dalianis T, Ramqvist T, Andersson B. Identification of a third human polyomavirus. *J Virol*. 2007;81:4130-6.

Alméras C, Foulongne V, Garrigue V, Szwarc I, Vetromile F, Segondy M, Mourad G. 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.

Alméras C, Vetromile F, Garrigue V, Szwarc I, Foulongne V, Mourad G. Monthly screening for BK viremia is an effective strategy to prevent BK virus nephropathy in renal transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2011;13:101-8.

Andrews CA, Shah KV, Daniel RW, Hirsch MS, Rubin RH. A serological investigation of BK virus and JC virus infections in recipients of renal allografts. *J Infect Dis.* 1988; 158:176–81.

Arthur RR, Dagostin S, Shah KV. Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1174-9.

Awadalla Y, Randhawa P, Ruppert K, Zeevi A, Duquesnoy RJ. HLA Mismatching increases the risk of BK virus nephropathy in renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2004; 4:1691-6.

Barri YM, Ahmad I, Ketel BL, Barone GW, Walker PD, Bonsib SM, Abul-Ezz SR. Polyoma viral infection in renal transplantation: the role of immunosuppressive therapy. *Clin Transplant.* 2001; 15:240–6.

Biel SS, Held TK, Landt O, Niedrig M, Gelderblom HR, Siegert W, Nitsche A.. Rapid quantification and differentiation of human polyomavirus DNA in undiluted urine from patients after bone marrow transplantation. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:3689–95.

Binet I, Nickeleit V, Hirsch HH, Prince O, Dalquen P, Gudat F, Mihatsch MJ, Thiel G. Polyomavirus disease under new immunosuppressive drugs: a cause of renal graft dysfunction and graft loss. *Transplantation*. 1999;67: 918-22.

Bofill-Mas S, Formiga-Cruz M, Clemente-Casares P, Calafell F, Girones R. Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. *J Virol*. 2001; 75:10290–99.

Bofill-Mas S, Pina S, Girones R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol*. 2000; 66:238–45.

Bohl DL, Storch GA, Ryschkewitsch C, Gaudreault-Keener M, Schnitzler MA, Major EO, Brennan DC. Donor origin of BK virus in renal transplantation and role of HLA C7 in susceptibility to sustained BK viremia. *Am J Transplant*. 2005;5:2213-21.

Boldorini R, Veggiani C, Turello E, Barco D, Monga G. Are sequence variations in the BK virus control region essential for the

development of polyomavirus nephropathy? *Am J Clin Pathol.* 2005;124:303-

12. A

Boldorini R, Brustia M, Veggiani C, Barco D, Andorno S, Monga G. Periodic assessment of urine and serum by cytology and molecular biology as a diagnostic tool for BK virus nephropathy in renal transplant patients. *Acta Cytol* 2005;49:235-43. B

Brennan DC, Agha I, Bohl DL, Schnitzler MA, Hardinger KL, Lockwood M, Torrence S, Schuessler R, Roby T, Gaudreault-Keener M, Storch GA. Incidence of BK virus with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *Am J Transplantation.* 2005;5:582-9

Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Hourmant M, Sebillé V, André-Garnier E, Imbert-Marcille BM. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2005; 5: 1926–1933.

Buehrig CK, Lager DJ, Stegall MD, Kreps MA, Kremers WK, Gloor JM, Schwab TR, Velosa JA, Fidler ME, Larson TS, Griffin MD. Influence of surveillance renal allograft biopsy on diagnosis and prognosis of polyomavirus-associated nephropathy. *Kidney Int* 2003; 64: 665-73.

Carbone M, Rizzo P, Pass HI. Simian virus 40, poliovaccines and human tumors: a review of recent developments. *Oncogene*. 1997;15:1877–88.

Chen T, Mattila PS, Jartti T, Ruuskanen O, Söderlund-Venermo M, Hedman K. Seroepidemiology of the newly found trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. *J Infect Dis*. 2011 204:1523-6.

Coleman DV. The cytodagnosis of human polyomavirus infection. *Acta Cyto*. 1975;19:93-6.

De Las Casas LE, Hoerl HD, Bardales RH, Pirsch JD, Sempf JM, Wetzel DJ, Stewart J, Oberley TD, Kurtycz DF. Utility of urinary cytology for diagnosing human polyoma virus infection in transplant recipients: a study of 37 cases with electron microscopic analysis. *Diagn Cythopathol*. 2001;25:376-81

Delbue S, Tremolada S, Elia F, Carloni C, Amico S, Tavazzi E, Marchioni E, Novati S, Maserati R, Ferrante P. Lymphotropic polyomavirus is detected in peripheral blood from immunocompromised and healthy subjects. *J Clin Virol*. 2010, 47:156-60.

Ding R, Medeiros M, Dadhania D, et al. Noninvasive diagnosis of BK virus nephritis by measurement of messenger RNA for BK virus VP1 in urine. *Transplantation*. 2002; 74: 987.

Dolei A, Pietropaolo V, Gomes E, Di Taranto C, Ziccheddu M, Spanu MA, Lavorino C, Manca M, Degener AM. Polyomavirus persistence in lymphocytes: prevalence in lymphocytes from blood donors and healthy personnel of a blood transfusion centre. *J Gen Virol*. 2000; 81: 1967–73.

Dorries K, ter Meulen V. Progressive multifocal leukoencephalopathy: detection of papovavirus JC in kidney tissue. 1983; *J Med Virol*. 11: 307-17.

Drachenberg CB, Beskow CO, Cangro CB, Bourquin PM, Simsir A, Fink J, Weir MR, Klassen DK, Bartlett ST, Papadimitriou JC. Human polyoma virus in renal allograft biopsies: morphological findings and correlation with urine cytology. *Hum Pathol*. 1999; 30: 970.

Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hirsch HH, Wali R, Crowder C, Nogueira J, Cangro CB, Mendley S, Mian A, Ramos E. Histological patterns of polyomavirus nephropathy: Correlation with graft outcome and viral load. *Am J Transplantation*. 2004; 4: 2082-92.

Drachenberg CB, Hirsch HH, Papadimitriou JC, Gosert R, Wali RK, Munivenkatappa R, Nogueira J, Cangro CB, Haririan A, Mendley S, Ramos E. Polyomavirus BK versus JC replication and nephropathy in renal transplant recipients: a prospective evaluation. *Transplantation*. 2007 15;84:323-30.

Duclos AJ, Krishnamurthi V, Lard M, Poggio E, Kleeman M, Winans C, Fatica R, Nurko S. Prevalence and clinical course of BK virus nephropathy in pancreas after kidney transplant patients. *Transplant Proc.* 2006;38:3666-72.

Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science.* 2008; 319:1096-100.

Fleiss L. Statistical methods for rates and proportions. New York (NY): John Wiley, 1981. p.212-36.

Funk GA, Steiger J, Hirsch HH. Rapid dynamics of polyomavirus type BK in renal transplant recipients. *J Infect Dis* 2006; 193:80-7.

Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, Brennan DC, Storch GA, Sloots TP, Wang D. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog.* 2007;3:e64.

Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet.* 1971; 1:1253-57.

Ginevri F, De Santis R, Comoli P, Pastorino N, Rossi C, Botti G, Fontana I, Nocera A, Cardillo M, Ciardi MR, Locatelli F, Maccario R, Perfumo F, Azzi A.

Polyomavirus BK infection in pediatric kidney-allograft recipients: a single-center analysis of incidence, risk factors, and novel therapeutic approaches. *Transplantation*. 2003; 75:1266.

Gosert R, Rinaldo CH, Funk GA, Egli A, Ramos E, Drachenberg CB, Hirsch HH. Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *J Exp Med*. 2008;205:841-52.

Goudsmit, J, Wertheim-van Dillen, P, van Strien, A, van der Noordaa, J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J. Med. Virol*. 1982; 10:91–99.

Hariharan S. BK virus nephritis after renal transplantation. *Kidney Int*. 2006; 69: 655–662.

Haririan A, Hamze O, Drachenberg CB, Ramos E, Weir MR, Klassen DK. Polyomavirus reactivation in native kidneys of pancreas alone allograft recipients. *Transplantation*. 2003; 75: 1186.

Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, Ginevri F, Gordon J, Limaye AP, Mihatsch MJ, Nickleit V, Ramos E, Randhawa P, Shapiro R, Steiger J, Suthanthiran M, Trofe J. Polyomavirus-associated nephropathy in renal

transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations.

Transplantation. 2005;79:1277-86. A

Hirsch HH, Drachenberg CB, Munivenkatappa R. Polyomavirus associated nephropathy (PVAN): Role of JC virus. *Virch Arch* 2005.447: 164-7. B

Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ, Steiger J. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Eng J Med*. 2002; 347:488-96

Hirsch HH, Mohaupt M, Klimkait T. Prospective monitoring of BK virus load after discontinuing sirolimus treatment in a renal transplant patient with BK virus nephropathy. *J Infect Dis*. 2001; 184: 1494-5.

Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3: 611. A

Hirsch HH. BK virus replication and disease in solid organ transplant recipients: An update. *Curr Opin Organ Transplant*. 2003; 262. B

Hodur DM, Mandelbrot D. Immunosuppression and BKV Nephropathy. *N Engl J Med*. 2002; 347: 2079-80.

Hoffman NG, Cook L, Atienza EE, Limaye AP, Jerome KR. Marked variability of BK virus viral load measurement using quantitative Real-Time PCR among commonly used assays. *J Clin Microbiol*. 2008;46:2671-80.

Hogan TF, Borden EC, McBain JA, Padgett BL, Walker DL. Human polyomavirus infections with JC virus and BK virus in renal transplant patients. *Ann Intern Med*. 1980;92:373.

Howell DN, Smith SR, Butterly DW, Klassen PS, Krigman HR, Burchette JL Jr, Miller SE. Diagnosis and management of BK polyomavirus interstitial nephritis in renal transplant recipients. *Transplantation*. 1999; 68:1279–88.

Huang G, Chen LZ, Qiu J, Wang CX, Fei JG, Deng SX, Li J, Chen GD, Zhang L, Fu Q, Zeng WT, Zhao DQ. Prospective study of polyomavirus BK replication and nephropathy in renal transplant recipients in China: a single-center analysis of incidence, reduction in immunosuppression and clinical course. *Clin Transplant*. 2010;24:599-609.

Hurault de Ligny B, Etienne I, Francois A, et al. Polyomavirus-induced acute tubulo-interstitial nephritis in renal allograft recipients. *Transplant Proc*. 2000; 32: 2760-1.

Hymes LC, Warshaw BL. Polyomavirus (BKV) in pediatric renal transplants: evaluation of viremic patients with and without BK associated nephritis. *Pediatr Transplantation*. 2006;10:920-2.

Ikegaya H, Saukko PJ, Tertti R, Metsarrine KP, Carr MJ, Crowley B, Sakurada K, Zheng HY, Kitamura T, Yogo Y. Identification of a genomic subgroup of BK polyomavirus spread in European populations. *J Gen Virol*. 2006, 87:3201-08.

Jin L, Gibson PE, Knowles WA, Clewey JP. BK virus antigenic variants: sequence analysis within the capsid VP1 epitope. *J Med Virol*. 1993;39:50-6.

Kang YN, Han SM, Park KK, Jeon DS, Kim HC. BK virus infection in renal allograft recipients. *Transplant Proc*. 2003; 35:275–7.

Kazory A, Ducloux D, Chalopin JM, Angonin R, Fontanière B, Moret H.. The first case of JC virus allograft nephropathy. *Transplantation*. 2003; 76:1653-5.

Khalili K, Stoner GL. Human polyomaviruses: molecular and clinical perspectives. New York (NY): Wiley-Liss; 2001.

Knowles WA. The epidemiology of BK Virus and the occurrence of antigenic and genomic subtypes. In: Khalili K, Stoner GL, editors. Human

polyomaviruses: molecular and clinical perspectives. New York (NY): Wiley-Liss; 2001;527–59.

Koukoulaki M, O'Donovan M, Pursglove S, Alexopoulou D, Hadjiconstantinou V, Drakopoulos S. Prospective study of urine cytology screening for BK polyoma virus replication in renal transplant recipients. *Cytopathology*. 2008;19:385-8.

Krumbholz A, Zell R, Egerer R, Sauerbei A, Hekming A, Gruhn B, Wutzler P. Prevalence of BK virus subtype I in Germany. *J Med Virology*. 2006; 78:1588-98.

Krumbholz A, Bininda-Emonds ORP, Wutzler P, Zell R. Evolution of four BK subtypes. *Infect Genet Evol*. 2008;8:632-43.

Kwak EJ, Vilchez RA, Randhawa P, Shapiro R, Butel JS, Kusne S. The pathogenesis and the management of polyomaviruses in transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2002; 35:1081-87.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33:159-74.

Leung AY, Chan M, Tang SC, Liang R, Kwong YL. Real-time quantitative analysis of polyoma BK viremia and viruria in renal allograft recipients. *J Virol Methods*. 2002; 103:51–6.

Li RM, Mannon RB, Kleiner D, Tsokos M, Bynum M, Kirk AD, Kopp JB. BK virus and SV40 co-infection in polyomavirus nephropathy. *Transplantation*. 2002; 74:1497–504.

Limaye AP, Jerome KR, Kuhr CS, Ferrenberg J, Huang ML, Davis CL, Corey L, Marsh CL. Quantitation of BK virus load in serum for the diagnosis of BK virus-associated nephropathy in renal transplant recipients. *J Infect Dis*. 2001; 183:1669–72.

Limaye AP, Smith KD, Cook L, Groom DA, Hunt NC, Jerome KR, Boeckh M. Polyomavirus nephropathy in native kidneys of non-renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2005; 5:614-20.

Mackenzie EF, Poulding JM, Harrison PR, Amer B. Human polyoma virus (HPV)—a significant pathogen in renal transplantation. *Proc Eur Dial Transplant Assoc*. 1978; 15:352–60.

Major EO. Human polyomavirus. In: Fields BN, Kinipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2000. p. 2175-96.

Marinelli K, Bagnarelli P, Gaffi G, Trappolini S, Leoni P, Paggi AM, Della Vittoria A, Scalise G, Varaldo PE, Menzo S. PCR real time assays for the early detection of BKV-DNA in immunocompromised patients. *New Microbiol.* 2007; 30:275.

Mathur VS, Olson JL, Darragh TM, Yen TS. Polyomavirus-induced interstitial nephritis in two renal transplant recipients: case reports and review of the literature. *Am J Kidney Dis.* 1997; 29:754.

Mengel M, Marwedel M, Radermacher J, Eden G, Schwarz A, Haller H, Kreipe H. Incidence of polyomavirus-nephropathy in renal allografts: influence of modern immunosuppressive drugs. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18:1190–6.

Moens U, Johansen T, Johnsen JI, Seternes OM, Traavik T. Noncoding control region of naturally occurring BK virus variants: sequence comparison and functional analysis. *Virus Genes.* 1995;10:261-75.

Monaco MC, Jensen PN, Hou J, Durham LC, Major EO. Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection. *J. Virol.* 1998; 72: 9918–23.

Montagner J, Michelon T, Fontanelle B, Oliveira A, Silveira J, Schroeder R, Neumann J, Keitel E, Alexandre CO. BKV-infection in kidney graft dysfunction. *Braz J Infect Dis*. 2010;14:170-4.

Nickeleit V, Hirsch HH, Binet IF, Gudat F, Prince O, Dalquen P, Thiel G, Mihatsch MJ. Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10: 1080-90.

Nickeleit V, Klimkait T, Binet IF, Dalquen P, Del Zenero V, Thiel G, Mihatsch MJ, Hirsch HH. Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. *N Engl J Med*. 2000; 342: 1309–15.

Nickeleit V, Singh HK, Mihatsch MJ. Polyomavirus nephropathy: morphology, pathophysiology, and clinical management. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2003; 12: 599-605.

Nishimoto Y, Zheng HY, Zhong S, Ikegaya H, Chen Q, Sugimoto C, Kitamura T, Yogo Y. An asian origin for subtype IV BK virus based on phylogenetic analysis. *Journal of Molecular Evolution*. 2007; 65:103-111.

Maia TM, Silva SF, Silva SL, Holanda MC, Nascimento JM, Ferreira MV. Polyomavirus-infected decoy cells in cytocentrifuged urine cytology specimens from renal transplant recipients. *Acta Cytol*. 2011;55:445-8.

Olsen GH, Andresen PA, Hilmarsen HT, Bjørang O, Scott H, Midtvedt K, Rinaldo CH. Genetic variability in BK Virus regulatory regions in urine and kidney biopsies from renal-transplant patients. *J Med Virol.* 2006; 78:384-93.

Olsen GH, Hirsch HH, Rinaldo CH. Functional analysis of polyomavirus BK non-coding control region quasispecies from kidney transplant recipients. *J Med Virol.* 2009;81:1959-67.

Padgett BL, Zu Rhein G., Walker D., Echroade R. and Dessel B. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet* 1971;1:1257–1260.

Pal A, Sirota L, Maudru T, Peden K, Lewis JR A. Real-time, quantitative PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. *J Virol Methods.* 2006; 135: 32-42

Pang XL, Doucette K, LeBlanc B, Cockfield SM, Preiksaitis JK. 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.* 2007;45:3568-73.

Pires EP, Bernardino-Vallinoto CV, Alves DM, Migone SR, Machado LF, Ishak MO, Ishak R, Cayres-Vallinoto IM, Vallinoto AC. Prevalence of

infection by JC and BK polyomaviruses in kidney transplant recipients and patients with chronic renal disease. *Transpl Infect Dis.* 2011;13:633-7.

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

Rahaminov R, Lustig S, Tovar A. BK polyoma virus nephropathy in kidney transplant recipients: the role of new immunosuppressive agents. *Transplant Proc* 2003; 35: 604–5.

Ramos E, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Hamze O, Fink JC, Klassen DK, Drachenberg RC, Wiland A, Wali R, Cangro CB, Schweitzer E, Bartlett ST, Weir MR. Clinical course of polyoma virus nephropathy in 67 renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 2145–51.

Ramos E, Drachenberg CB, Portocarrero M, Wali R, Klassen DK, Fink JC, Farney A, Hirsch H, Papadimitriou JC, Cangro CB, Weir MR, Bartlett ST. BK virus nephropathy diagnosis and treatment: experience at the University of Maryland. *Renal Transplant Program. Clin Transpl.* 2003; 143-53. A

Ramos E, Aoun S, Harmon WE. Expanding the donor pool: effect on graft outcome. *J Am Soc Nephrol.* 2003;13:2590-9. Review. B

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.* 2004; 42: 1176–1180.

Randhawa P, Zygmunt D, Shapiro R, Vats A, Weck K, Swalsky P, Finkelstein S. Viral regulatory region sequence variations in kidney tissue obtained from patients with BK virus nephropathy. *Kidney Int.* 2003; 64: 743-7.

Randhawa PS, Finkelstein S, Scantlebury V, Shapiro R, Vivas C, Jordan M, Picken MM, Demetris AJ. Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation.* 1999; 67: 103–9.

Randhawa PS, Vats A, Shapiro R. BK virus: Discovery, epidemiology, and biology. *Graft.* 2002; 2 (Suppl 5): S19–S27.

Randhawa PS, Khaleel-Ur-Rehman K, Swalsky PA, Vats A, Scantlebury V, Shapiro R, Finkelstein S. DNA sequencing of viral capsid protein VP-1 region in patients with BK virus interstitial nephritis. *Transplantation.* 2002; 15;73:1090-4.

Randhawa P, Uhrmacher J, Pasculle W, Vats A, Shapiro R, Eghtsead B, Weck K. A comparative study of BK and JC virus infections in organ transplant recipients. *J Med Virol.* 2005; 77: 238. A

Randhawa P, Vats A, Shapiro R. Monitoring for polyomavirus BK and JC in urine: comparison of quantitative polymerase chain reaction with urine cytology. *Transplantation*. 2005;79:984-6. B

Renoult E, Coutlée F, Pâquet M, St Louis G, Girardin C, Fortin MC, Cardinal H, Lévesque R, Schürch W, Latour M, Barama A, Hébert MJ. Evaluation of a preemptive strategy for BK polyomavirus-associated nephropathy based on prospective monitoring of BK viremia: a kidney transplantation center experience. *Transplant Proc*. 2010;42:4083-7.

Sachdeva MS, Nada R, Jha V, Sakhuja V, Joshi K. The high incidence of BK polyoma virus infection among renal transplant recipients in India. *Transplantation*. 2004; 77: 429-31.

Scuda N, Hofmann J, Calvignac-Spencer S, Ruprecht K, Liman P, Kühn J, Hengel H, Ehlers B. A novel human polyomavirus closely related to the African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *J Virol*. 2011; 85:4586-90.

Seif I, Khoury G, Dhar R. The genome of human papovavirus BKV. *Cell* 1979;18:963-77.

Shah KV, Daniel R, Warszawski R. High prevalence of antibodies to BK virus, an SV40-related papovavirus, in residents of Maryland. *J Infect Dis.* 1973; 128: 784–7.

Shah KV. Human polyomavirus BKV and renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15: 754–5.

Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe.* 2010;7:509-15.

Smith JM, McDonald RA, Finn LS, Healey PJ, Davis CL, Limaye AP. Polyomavirus nephropathy in pediatric kidney transplant recipients. *Am J Transplantation.* 2004; 4: 2109-17.

Smith JM, McDonald RA, Limaye AP. BK polyoma virus nephropathy in pediatric renal transplant patients: A case series. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 780.

Sugimoto C, Hasegawa M, Kato A, Zheng A, Ebihara H, Taguchi F, Kitamura F. Evolution of human polyomavirus JC; implications for the populations history of humans. *J Mol Evol.* 2002, 54: 285-97.

Takasaka T, Goya N, Tokumoto T, Tanabe K, Toma H, Ogawa Y, Hokama Y, Momose A, Chen Q, Zheng HY, Kitamura T. Subtypes of BK virus prevalent in Japan and variation in their transcriptional control region. *J Gen Virol*. 2004; 84:2821-7.

Thakur R, Joshi K, Minz M, Singla A, Nada R, Arora S, Jha V, Sakhuja V. Dual positivity of donor and recipient plasma for BK virus confers a high risk for development of bk nephropathy in renal allograft. *Transplant Proc*. 2012;44(3):717-20.

Thompson, JD, Gibson, TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins, DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids*. 1997; 25:4876–82.

Tremolada S, Delbue S, Castagnoli L, Allegrini S, Miglio U, Boldorini R, Elia F, Gordon J, Ferrante P. Mutations in the external loops of BK virus VP1 and urine viral load in renal transplant recipients. *J Cell Physiol*. 2010;222:195-9. A

Tremolada S, Akan S, Otte J, Khalili K, Ferrante P, Chaudhury PR, Woodle ES, Trofe-Clark J, White MK, Gordon J. Rare subtypes of BK virus are viable and frequently detected in renal transplant recipients with BK virus-associated nephropathy. *Virology*. 2010;404:312-8. B

Trofe J, Gaber LW, Stratta RJ, Shokouh-Amiri MH, Vera SR, Alloway RR, Lo A, Gaber AO, Egidi MF. Polyomavirus in kidney and kidney-pancreas transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2003;5:21–8.

Van der Meijden E, Janssens RW, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MC. Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog*. 2010;6:e1001024.

Vats A, Shapiro R, Singh RP, Randhawa P, Scantlebury V, Tuzuner A, Saxena M, Moritz ML, Beattie TJ, Gonwa T, Green MD, Ellis D. Quantitative viral load monitoring and cidofovir therapy for the management of BK-associated nephropathy in children and adults. *Transplantation*. 2003;75:105-12.

Vera-Sempere FJ, Rubio L, Felipe-Ponce V, Garcia A, Sanahuja MJ, Zamora I, Ramos D, Beneyto I, Sánchez-Plumed J. Renal donor implication in the origin of BK infection: analysis of genomic viral subtypes. *Transplant Proc*. 2006;38:2378-81.

Viscount HB, Eid AJ, Espy MJ, Griffin MD, Thomsen KM, Harmsen WS, Razonable RR, Smith TF. Polyomavirus polymerase chain reaction as a surrogate marker of polyomavirus-associated nephropathy. *Transplantation*. 2007;84:340-5.

Zalona AC, Lopes GS, Schrago CG, Gonçalves RT, Zalis MG, Varella RB. Molecular characterization of BK polyomavirus subtypes in renal transplant recipients in Brazil. *J Med Virol.* 2011;83:1401-5.

Zambrano A, Kalantari M, Simoneau A, Jensen JL, Villarreal LP. Detection of human polyomaviruses and papillomaviruses in prostatic tissue reveals the prostate as a habitat for multiple viral infections. *Prostate.* 2002;53:263–76.

Zwickl, DJ. *Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion* (PhD thesis). Austin: The University of Texas; 2006.

Zheng H, Nishimoto Y, Chen QT, Hasegawa M, Zhong S, Ikegawa H, Ohno N, Sugimoto C, Takasaka T, Kitamura T, Yogo Y. Relationships between BK virus lineages and human populations. *Microbes Infect.* 2007; 9:204-13.

Zu Rhein GM, Chou SM. Particles resembling papovaviruses in human cerebral demyelinating disease. *Science.* 1965; 148:1477-9.