**Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**

Paulo Roberto Palma Urbano

**Caracterização do Poliomavirus associado a Tricodisplasia
Spinulosa em indivíduos imunocompetentes e imunodeprimidos.**

**São Paulo
2018**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Urbano, Paulo Roberto Palma

Caracterização do Poliomavirus associado a Tricodisplasia Spinulosa em indivíduos imunocompetentes e imunodeprimidos / Paulo Roberto Palma Urbano. – São Paulo, 2018.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Camila Malta Romano

Descritores: 1. POLYOMAVIRUS. 2. HOSPEDEIRO IMUNOCOMPROMETIDO. 3. DERMATOLOGIA.

USP/IMTSP/BIB-03/2018.

Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Paulo Roberto Palma Urbano

**Caracterização do Poliomavirus associado a Tricodisplasia
Spinulosa em indivíduos imunocompetentes e imunodeprimidos.**

Tese apresentada ao Instituto de
Medicina Tropical da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor
em Ciências

Área de concentração: Doenças Tropicais
e Saúde Internacional

Orientador: Dra. Camila Malta Romano

São Paulo
2018

DEDICATÓRIA

Dedicar o trabalho a alguém específico é muito complexo, ... não por escolher alguém, mas por não chatear as tantas outras pessoas que estiveram ao meu lado...

Dedico esse trabalho em especial a 2 pessoas...

Primeiro para alguém que ficaria muito feliz por ter um neto doutor... Antônio Carlos Palma (*in memoriam*) De onde você estiver... esse orgulho você já pode ter!

Segundo, para a paciente VRB (*in memoriam*), pois felizmente e infelizmente, graças a ela, tive a chance de trabalhar com algo novo... Algo fundamental ao desenvolvimento desse trabalho. Obrigado pelas amostras...

AGRADECIMENTO

Difícil começar a agradecer tantas pessoas que estiveram ao meu lado, ou que simplesmente passaram pela minha vida deixando alguma marca durante esses 4 longos anos que passaram voando.... Difícil também porque provavelmente 90% delas não irá ler essa dedicatória.... Quiçá o conteúdo desse trabalho... Mas, vamos lá!

Primeiro, obviamente, agradecer a **Deus** por me colocar sempre no lugar certo e na hora certa, me dando oportunidades que eu precisava, me abençoando com o que eu merecia, e mesmo muitas vezes eu fazendo diversos planos, ele sempre me provou que os dele são sempre melhores!

Segundo, e obviamente também meus pais, **Silvia** e **Flavio**, que me aguentaram nos momentos difíceis... me deram suporte não só financeiro, mas emocional para ajudar a trilhar meu caminho e alcançar meus objetivos;

A minha orientadora, **Camila Romano**, por colocar em minhas mãos a responsabilidade desse projeto, que nasceu como uma urgência no laboratório... que me aceitou como aluno meio com o pé atrás (que eu sei hahaha), mas que depois me aguentou por todo esse tempo meio a broncas (muitas) e risadas... Me ajudando a crescer como pessoa e profissionalmente, me apoiando nas decisões difíceis e nos momentos que muitos teriam desistido, eu insisti e ela esteve ao meu lado.... Nos confrontos por amostras, artigos e resultados. Desculpe se em algum momento te decepcionei, não foi a intenção. Muito obrigado.

A minha namorada... **Camila**... que mesmo com o stress dessa reta final me proporcionou ótimas risadas quando eu tentava explicar para ela sobre oligonucleotídeos e outros nomes complexos... que “perdeu” alguns finais de semana esperando eu acabar de fazer as coisas da tese... mas sempre ao meu lado;

Aos meus amigos e amigas do laboratório... “**CamisTeam**”, Tina, Luiz, Felipe, Carol, Thiaguinho, Lucas, Cibeles, Gi, Babi, Fran.. além do Toni, Anderson e Nathalia... Ganhamos mal, mas nos divertimos... As risadas sempre valem a pena né?!;

Ao meu ex-orientador, Dr. **Claudio Pannuti**... que no início dessa nova jornada me desafiou a ter mais artigos que meus antecessores no laboratório... Desafio esse que cumpri com Louvor (até a impressão desse exemplar... 8 publicados, 1 aceito e 3 submetidos). Obrigado por acolher no laboratório por quase 10 anos atrás aquela criança imatura que não sabia nada sobre “fazer ciência”!;

Aos funcionários do laboratório, Dona **Sonia e Luciano**... pelo exemplo de funcionário que são e por aguentarem sempre eu atormentando, pedindo cotação, saco de lixo, caneta, caixa e tudo mais que eu precisava... E não foi só nesses últimos 4 anos... Quase 10!;

Obrigado a chefa do laboratório de Virologia / LIM 52, Dra. **Cristina Fink**, Dra. **Clarisse Machado** e dra. **Cassia Correa**, por permitirem que eu desenvolvesse, não só esse, mas diversos estudos que realizei ao longo do doutorado;

Aos membros da UTR, em especial a Dra. **Ligia Pierroti** por ter enviado a amostra inicial para realização desse estudo;

Aos membros da banca de qualificação, Dra. **Thelma Okay**, Dr. **Walmar Rocalli**, Dr. **Jose Levi** pelas sugestões e correções;

Ao Dr. **Paulo Braz**, Dra. **Maria Aparecida** e Dra. **Suelen Paesi** por confiar no meu trabalho e pela oportunidade de trabalhos colaborativos;

A todos os **amigos** do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da USP, por fazerem do nosso laboratório um ambiente agradável;

Ao Prof. Dr. **Alúcio Segurado**, professor titular do departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias, por ter aceito ser meu supervisor durante 3 Programas de Aperfeiçoamento de Ensino consecutivos;

A **secretária do Programa de Pós-Graduação** do Instituto de Medicina Tropical, **Eliane**, obrigado pelo suporte oferecido e por aguentar mil e uma pentelhações e desesperos;

Aos alunos e **funcionários** do laboratório de Protozoologia, por cederem espaço muitas vezes que nossos equipamentos não estavam funcionando;

Aos amigos **Bruna e Erico**, que sempre insistiram para eu sair, ouvindo diversos “nãos” pois precisava acabar esse trabalho;

A minha **Família Palma**... Apesar das brigas hahaha... tem amor... família né?!;

A minha **Família Urbano**... mesmo tendo contato só com meia dúzia... é meia dúzia de amor!;

Aos **amigos da Pós...** Ivane, Hugo, Erika, Claudinha e Poli que sabiam que eu estava perto de defender... e me ajudaram a trilhar esse caminho paralelo;

Aos **amigos e amigas**, Ingrid, Aline, Tali (tinha), Roger, Evelin, Tati Gogó, Leo Bucci, Carou, Carolena... que mesmo longe fisicamente, sempre estão perto... bem perto... no coração!;

Aos **amigos de almoço...** Andrés, Daniel, Fujita e Fábio... pelas risadas sempre na escolha do local... apesar do Lisboa ser top!;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela concessão da bolsa de doutorado.;

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste estudo.

Que os vossos esforços desafiem as
impossibilidades, lembrai-vos de que as
grandes coisas do homem foram conquistadas
do que parecia impossível.

Charles Chaplin

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA	2
1.1. HISTÓRICO DOS POLIOMAVÍRUS	2
1.2 VIRUS E CÂNCER	8
1.2.1 INTERAÇÕES PROTÊICAS ENTRE OS POLIOMAVÍRUS E O HOSPEDEIRO	11
1.3 POLIOMAVIRUS TSPyV	13
1.3.1 ESTRUTURA GENÔMICA	13
1.3.2 TRICODISPLASIA SPINULOSA (TS)	17
1.4 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	19
1.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE ESTE ESTUDO	22
 2. JUSTIFICATIVA	 26
 3. OBJETIVOS DO ESTUDO	 29
3.1 OBJETIVO GERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
 4. MATERIAIS E MÉTODOS	 32
4.1 DESENHO DO ESTUDO	32
4.2 ASPECTOS ÉTICOS	33
4.3 ORIGEM DAS AMOSTRAS	35
4.4 CONSTRUÇÃO DO CONTROLE POSITIVO PARA OS TESTES MOLECULARES	38
4.5 EXTRAÇÃO DE DNA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS UTILIZADAS	40

4.6 DESENHO DOS <i>PRIMERS</i> PARA AS REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	41
4.7 PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS MOLECULARES	47
4.7.1 Padronização das Reações de PCR Convencional.	47
4.7.2 PCR em tempo real (qPCR)	47
4.7.2.1 Padronização da Reação de qPCR Utilizando a Metodologia TaqMan	48
4.7.2.2 Padronização da Reação de qPCR Utilizando a Metodologia SyBR Green	48
4.7.3 Determinação da sensibilidade analítica dos testes de qPCR	49
4.8 SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS POSITIVAS	51
4.8.1 Reação de Sequenciamento Utilizando a Metodologia Sanger	51
4.8.2 Sequenciamento das Amostras Utilizando NGS – <i>Next Generation Sequencing</i> - Plataforma Ion Torrent	53
4.9 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS	57
4.10 ISOLAMENTO DO POLIOMAVIRUS TSPyV EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES.	59
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
5. RESULTADOS	66
5.1 PADRONIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA TSPyV	66
5.1.1 PCR convencional utilizado para teste diagnóstico de detecção do TSPyV	66
5.1.2 PCR convencional utilizado para amplificação do TSPyV com a finalidade de sequenciamento utilizando a metodologia Sanger – “ <i>ShortPCR</i> ”	70
5.1.3 PCR convencional utilizado para amplificação do TSPyV com a finalidade de sequenciamento utilizando a metodologia NGS – “ <i>LongPCR</i> ”	72
5.2 PADRONIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO POLIOMAVÍRUS TSPyV EM AMOSTRAS DE URINA ATRAVÉS DA qPCR POR METODOLOGIA DE SYBR GREEN®	73
5.2.1 Determinação da Concentração de <i>Primers</i>	73

5.2.2 Adição de enzima <i>Platinum Taq</i> Polimerase na Reação de SYBR Green	75
5.2.3 Quantificação e Identificação do <i>cut-off</i> Utilizando Diluições em Decaplicata do Plasmídeo Através da qPCR – Teste de <i>PROBIT</i> .	76
5.2.4 Cálculo da Sensibilidade, Reprodutibilidade e Especificidade das Reações de qPCR Utilizando Metodologia SYBR Green	79
Tabela 6: Determinação do <i>cut-off</i> da reação de PCR em tempo real para TSPyV através de diluições seriadas do plasmídeo, testadas em “decaplicatas” utilizando a metodologia SyBR. Cópias por reação medidas em cp/mL.	79
5.3 PADRONIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO POLIOMAVÍRUS TSPyV EM AMOSTRAS DE URINA ATRAVÉS DA qPCR POR METODOLOGIA TAQMAN	81
5.3.1 Determinação da Concentração de <i>Primers</i>	81
5.3.2 Quantificação e Identificação do <i>cut-off</i> Utilizando Diluições em Decaplicata do Plasmídeo Através da qPCR – Teste de <i>PROBIT</i> .	81
5.3.3 Cálculo da Sensibilidade, Reprodutibilidade e Especificidade das Reações de qPCR Utilizando Metodologia TAQMAN	84
5.4 DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA E CARGA VIRAL DO POLIOMAVÍRUS TS EM AMOSTRAS DE SANGUE E URINA DE INDIVÍDUOS IMUNOCOMPROMETIDOS E SADIOS	85
5.5 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE TSPyV EM AMOSTRAS DE ÁGUA	89
5.6 DETERMINAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE TSPyV EM AMOSTRAS DE URINA, LEITE MATERNO E SALIVA E AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL TRANSMISSÃO VERTICAL DO VÍRUS.	89
5.7 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	89
5.8 ISOLAMENTO DO POLIOMAVÍRUS TSPyV EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES.	97
5.8.1 Protocolo Utilizando no Laboratório de Virologia.	97
5.8.2 Protocolo Utilizando no Laboratório de Microbiologia do ICB – USP.	98
6. DISCUSSÃO	101

7. CONCLUSÃO	110
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
9. ANEXOS	128
9.1 - Aprovação do projeto de pesquisa intitulado “Detecção e caracterização molecular dos novos poliomavírus humanos em amostras biológicas provenientes de indivíduos submetidos a imunossupressão” sob o protocolo número 513.805 de 2013.	128
9.2 - Aprovação do projeto de pesquisa intitulado “Prevalência, caracterização genotípica e determinação da dinâmica de excreção do Poliomavirus humano BK em amostras de urina de indivíduos saudáveis” sob o protocolo número 0032/11 de 2011, o qual foi utilizado as amostras de urina de indivíduos sadios para esse estudo.	130
9.3 - Aprovação do projeto de pesquisa intitulado “Determinação da prevalência e caracterização molecular dos Poliomavirus humanos - BK e JC - em pacientes submetidos a transplante renal” sob o protocolo número 0569/11 de 2011, o qual foi utilizado as amostras de urina de indivíduos submetidos a transplante renal para esse estudo.	131
9.4 - Aprovação do projeto de pesquisa intitulado “Infecção pelos Poliomavirus humanos BK e JC em pacientes submetidos a transplante renal: segmento clínico-laboratorial” sob o protocolo número 0234/10 de 2010, o qual foi utilizado as amostras de urina de indivíduos submetidos a transplante renal para esse estudo	132
9.5 - Aprovação do projeto de pesquisa intitulado “Investigação do potencial de transmissão vertical dos poliomavirus ” sob o protocolo número 1.464.831 de 2016, o qual foi utilizado as amostras de leite materno e urina das mães, e salivas dos recém-nascidos provenientes do bio-repositório da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP-USP, aprovadas pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP.	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação física dos Poliomavirus.	15
Figura 2 - O número de triangulação do Icosaedro	15
Figura 3 – Paciente no momento da suspeita de TS.	19
Figura 4 - Análise das sequências geradas utilizando a ferramenta de montagem “denovo” no programa de análises CLC Genomics Workbench	23
Figura 5 - Localização dos pontos de coleta no Arroio Belo	37
Figura 6. Plasmídeo pUC57	38
Figura 7 – Ilustração evidenciando os <i>primers</i> desenhados neste estudo para o sequenciamento do genoma completo do TSPyV.	46
Figura 8 – Ion 314™ Chip V2	54
Figura 9 – E-Gel® <i>SizeSelect</i> ™ e E-Gel iBase™ Power System.	55
Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com SYBR Safe™ 0,1µL/mL para teste de temperatura de anelamento e de concentração final de <i>primers</i> .	67

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com SYBR Safe™ 0,1µL/mL para teste de concentração final de *primers*. _____67

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com SYBR Safe™ 0,1µL/mL para teste de concentração final de *primers*. _____68

Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com SYBR Safe™ 0,1µL/mL das reações de PCR qualitativo usando diferentes concentrações de dNTP. _____69

Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com SYBR Safe™ 0,1µL/mL das amostras amplificadas por PCR convencional utilizando os *primers* nomeados como “*ShortPCR*”. _____71

Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose das reações de PCR qualitativo contendo material amplificado de TSPyV utilizando *primers* denominados “*LongPCR*”, com melhor resultado de temperatura de anelamento dos *primers*. _____73

Figura 16 - Amplificação de curvas-padrão por técnica de reação em cadeia por polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando a metodologia SyBR. ____74

Figura 17 - Amplificação de curvas-padrão por técnica de reação em cadeia por polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando a metodologia SyBR já com a adição da enzima Taq Polimerase. _____76

Figura 18 - Amplificação de curvas-padrão por técnica de reação em cadeia por polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando a metodologia SyBR já com a adição da enzima Taq Polimerase. _____	77
Figura 19 - Regressão linear das curvas-padrão do vírus TSPyV. _____	78
Figura 20 - Amplificação de curvas-padrão por técnica de reação em cadeia por polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). _____	82
Figura 21 - Regressão linear das curvas-padrão do vírus TSPyV. _____	83
Figura 22 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança do genoma completo do TSPyV, utilizando o modelo de substituição nucleotídica HKY+I. _____	92
Figura 23 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança do fragmento do Antígeno T Grande (LTA _g) do nucleotídeo de posição 2735 ate 3689 do TSPyV, utilizando o <i>primers</i> “ShortPCR” P7 e P8, obtida com o algoritmo de reconstrução filogenética “máximo verossimilhança”, utilizando o modelo de substituição nucleotídica F81+I. _____	93
Figura 24 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança do fragmento do Antígeno T Grande (LTA _g) do nucleotídeo de posição 3665 (<i>primer reverse</i> P1) até 4357 (<i>primer reverse</i> P2) do TSPyV, obtida com o algoritmo de reconstrução filogenética “máximo verossimilhança”, utilizando o modelo de substituição nucleotídica F81+I. _____	94

Figura 25 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança dos fragmentos do Antígeno T Grande (LTA_g) juntos na mesma análise, denominado como “Concatenado”, obtida com o algoritmo de reconstrução filogenética “máximo verossimilhança”, utilizando o modelo de substituição nucleotídica F81+I. _____95

Figura 26 - Análise e comparação do fragmento da região de controle não codificante das sequências completas do TSPyV obtidas nas amostras desse estudo comparadas com algumas referências obtidas no *GenBank* _____97

Figura 27 – Poliomavirus Humano TSPyV presente em cultura de células HF4 _____98

Figura 28 – Monocamada de células VERO antes da inoculação viral (esquerda) e após 4 passagem a partir da inoculação viral (direita) _____99

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Primers utilizados nas reações de qPCR com metodologia SyBR e PCR convencional utilizando o software Primer3. _____ 42
- Tabela 2** - *Primers* utilizados na reação de qPCR utilizando o *software* RTD®. ____ 43
- Tabela 3** - *Primers* utilizados para a reação de PCR convencional de fragmentos curtos (*Short* PCR) e sequenciamento por Sanger. _____ 44
- Tabela 4** - *Primers* utilizados para a reação de PCR convencional de fragmentos grandes (*Long* PCR) e sequenciamento de nova geração. _____ 45
- Tabela 5:** Tabela identificando o tamanho do fragmento dos *primers* utilizados para sequenciamento utilizando a metodologia Sanger. _____ 70
- Tabela 6:** Determinação do *cut-off* da reação de PCR em tempo real para TSPyV através de diluições seriadas do plasmídeo, testadas em “deaplicatas” utilizando a metodologia SyBR. _____ 79
- Tabela 7:** Determinação do *cut-off* da reação de PCR em tempo real para TSPyV através de diluições seriadas do plasmídeo, testadas em “deaplicatas” utilizando a metodologia TaqMan. _____ 84

Tabela 8: Indivíduos imunocomprometidos positivos para virúria de TSPyV, classificados por idade, gênero e etnia, conforme coletas de sangue e urinas_87

Tabela 9. Indivíduos submetidos a transplante renal positivos para viremia de TSPyV. _____88

LISTA DE ABREVIACÕES

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

HAART – Terapia antirretroviral altamente ativa

BKPyV – BK Poliomavírus Humano

BKVAN – Nefropatias associadas ao Poliomavirus humano BK

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

cm³ – Centímetros Cúbicos

ddNTP – Dideoxynucleotides fosfatase

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DEPC – *diethylpyrocarbonate* - Dietilpirocarbonato

dNTP - *deoxyribonucleotide triphosphate* – Deoxiribunucleotideo trifosfatado

EBV – Epstein-Barr Virus

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

emPCR – PCR de emulsão

FAM - *6-carboxyfluorescein reporter*

FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

FMUSP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Haart - *highly active antiretroviral therapy*

HBV – Vírus da Hepatite B

HCV – Vírus da Hepatite C

HEK – *Human Embryonic Kidney*

HPV – Papilomavírus Humano

HPyV10 - Poliomavirus Humano 10

HPyV12 - Poliomavirus Humano 12

HPyV6 – Poliomavirus Humano 6

HPyV7 – Poliomavirus Humano 7

HPyV9 – Poliomavirus Humano 9

HPyVs – Poliomavirus humanos

HTLV – Vírus Linfotrópico das células T humanas

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

ICB – Instituto de Ciências Biomédicas

IMT – Instituto de Medicina Tropical

JCPyV – JC Poliomavírus Humano

KCl – Cloreto de Potássio

KIPyV – KI Poliomavírus Humano

KSHV – Vírus associado ao Sarcoma de Kaposi

LEMP – Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva

LLC – Leucemia Linfóide Crônica

MCPyV – Poliomavírus Humano associado ao câncer de células Merkel

mL - mililitros

mM - Milimolar

MWPyV – Malawi Poliomavirus Humano

MPyV – Mexico Poliomavirus Humano

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NCCR – Região de controle não codificadora

ng - Nanogramas

NGS – *Next Generation Sequencing*

NIH - National Institutes of Health

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF – *Open Reading Frames*

Pb – Pares de base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PGM – *Personal Machine Genome*

pH - potencial Hidrogeniônico

PM – Peso Molecular

pRb – Proteína Retinoblastoma

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa – reação em tempo real

SFB – Soro Fetal Bovino

STLPyV – Saint Louis Poliomavirus Humano

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TS – Tricodisplasia Spinulosa associada ao Poliomavirus humano

TSPyV – Poliomavirus Humano associado a Tricodisplasia Spinulosa

uL - Microlitro

UTR – Unidade de Transplante Renal

WUPyV – WU Poliomavírus Humano

LISTA DE PUBLICAÇÕES

1. **Urbano PR**, Fujita DM, Romano CM. Reemergence of mumps in São Paulo, Brazil - the urgent need for booster shot campaign to prevent a serious infectious disease. **2017**. Rev Soc Bras Med Trop. Jul-Aug;50(4):535-538. doi: 10.1590/0037-8682-0320-2016
2. **Urbano PR**, Oliveira AC, Romano CM. Alternative methods for sequencing full TSPyV genomes using sanger or NGS. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. **2016** Dec 8;58:92. doi: 10.1590/S1678-9946201658092
3. **Urbano PR**, Oliveira RR, Romano CM, Pannuti CS, Fink MC. **2016**. Occurrence, genotypic characterization, and patterns of shedding of human polyomavirus JCPyV and BKPyV in urine samples of healthy individuals in São Paulo, Brazil. J Med Virol. 88;1:153-158. doi: 10.1002/jmv.24318.
4. **Urbano PR**, Nali LH, Bicalho CS, Pierrotti LC, David-Neto E, Pannuti CS, Romano CM. **2016**. New findings about trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (TSPyV) - novel qPCR detects TSPyV-DNA in blood samples. Diagn Microbiol Infect Dis. 84;2:123-124. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.011.
5. First phylogenetic analysis of dengue virus serotype 4 circulating in Espírito Santo state, Brazil, in 2013 and 2014. Vicente CR, Pannuti CS, **Urbano PR**, Felix AC, Cerutti Junior C, Herbinger KH, Fröschl G, Romano CM. Epidemiol Infect. **2018** Jan;146(1):100-106. doi: 10.1017/S0950268817002618.

6. Bicalho CS, Oliveira RR, Pierrotti LC, Fink MC, **Urbano PR**, Nali LH, Luna EJ, Romano CM, David, David-Neto E, Pannuti CS. **2016**. Pretransplant shedding of BK virus in urine is unrelated to post-transplant viruria and viremia in kidney transplant recipients. Clin Transplant. doi: 10.1111/ctr.12752.
7. Fujita DM, Nali LH, **Urbano PR**, Soeiro DM, Andrade HF Jr. **2016**. The fast transmission of infectious diseases around the world - a new concern to the public health. Braz J Infect Dis. pii: S1413-8670(16)30111-8. doi: 10.1016/j.bjid.2016.06.003
8. **Urbano PR**, Pannuti CS, Pierrotti LC, David-Neto E, Romano CM. **2014**. Rapid detection of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in skin biopsy specimen. Genome Announc. 2;4:e00694-14. doi:10.1128/genomeA.00694-14.
9. Fujita DM, Nali LHS, **Urbano PR**, Luna EJA. Sexual education for senior age: Continuous increase in reported cases of HIV in Brazil – 2005/2015. 2018. Biomed J Sci & Tech Res. In press. DOI: 10.26717/BJSTR.2018.02.000782

RESUMO

Caracterização do Poliomavirus associado a Tricodisplasia Spinulosa em indivíduos imunocompetentes e imunodeprimidos

Trichodysplasia spinulosa (TS) é uma doença proliferativa de pele observada em pacientes imunocomprometidos. Caracteriza-se pela formação de espinhas de queratina conhecidos como espículas, acantose epidérmica, dilatação do folículo piloso, queratose actínica, queda dos pelos, pápulas foliculares e, que normalmente, se manifestam na região facial do paciente e extremidades do corpo (constantemente confundida com danos por exposição prolongada ao sol). A TS resulta da infecção ativa com o poliomavírus TS-associado (TSPyV), onde observa-se alta carga viral, expressão de proteína do vírus e formação de partículas. Este estudo desenvolveu métodos moleculares de detecção e sequenciamento do genoma total e parcial de TSPyV e utilizou-se destes métodos para determinar padrões de excreção e viremia em indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes, bem como explorar possíveis vias de transmissão. Ainda, características genéticas e filogenéticas do TSPyV também foram determinadas. Apesar de observamos alta taxa de excreção urinária em indivíduos imunocomprometidos (57,7%), o vírus não foi encontrado em amostras de água do meio ambiente. Ainda em termos de excreção urinária do TSPyV, apenas 1,4% dos indivíduos imunocompetentes apresentaram virúria (diferente do que se observa para os poliomavirus JCPyV e BKPyV), mas o vírus foi encontrado em leite materno, sugerindo assim a possibilidade de haver transmissão vertical do TSPyV. As análises filogenéticas revelaram a existência de 2 linhagens de vírus circulantes em nosso meio, com características distintas dos já descritos na literatura. As diferenças observadas foram suficientes para que os vírus sejam caracterizados como novos genótipos circulantes de TSPyV.

Descritores: 1. POLYOMAVIRUS. 2. HOSPEDEIRO IMUNOCOMPROMETIDO. 3. DERMATOLOGIA

SUMMARY

Characterization of Polyomavirus associated with Spinulosa trichodysplasia in immunocompetent and immunocompromised individuals

Trichodysplasia spinulosa (TS) is a proliferative skin disease seen in immunocompromised patients. It is characterized by the formation of keratin spines known as spicules, epidermal acanthosis, hair follicle dilatation, actinic keratosis, hair loss, follicular papules and, which usually manifest in the facial region and extremities of the body (constantly confounded with damage from prolonged exposure to the sun). TS results from active infection with TS-associated polyomavirus (TSPyV), where high viral load, virus protein expression and particle formation are observed. This study developed molecular methods for detection and sequencing the total and partial genome of TSPyV and, employing these methods, determined patterns of excretion and viremia in immunocompromised and immunocompetent individuals, as well as explored possible transmission pathways. Genetic and phylogenetic characteristics were also determined. Although we observed high rate of urinary shedding in immunocompromised individuals (57.7%), the virus was not found in environmental water samples. Also in terms of urinary excretion of TSPyV, only 1.4% of immunocompetent individuals presented viruria (different from what is observed for polyomaviruses JCPyV and BKPyV), but the virus was found in breast milk, thus suggesting the possibility of vertical transmission. Phylogenetic analyzes revealed the existence of 2 circulating virus strains in our country, with different characteristics from those already described in the literature. The differences seem to be sufficient to characterize the viruses as new genotypes of TSPyV.

Descriptors: 1. POLYOMAVIRUS. 2. IMMUNOCOMPROMISED HOST. 3. DERMATOLOGY

INTRODUÇÃO

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. HISTÓRICO DOS POLIOMAVÍRUS

A família *Polyomaviridae* é formada por mais de 100 vírus descritos até o momento, sendo que destes 14 podem infectar o homem e os outros quase 90, diferentes espécies de animais como macacos, bovinos, coelhos, camundongos entre outros ¹⁻⁴. Os Poliomavírus humanos partilham como características comuns a todos os membros da família a presença de ácido desoxirribonucleico (DNA) como material genético, o formato icosaédrico e a ausência de envelope. Como a maioria dos vírus de DNA, sua montagem é feita no núcleo celular ⁵.

Seus genomas apresentam relativamente alta similaridade entre si e são homólogos ao Poliomavirus SV40 ⁶. Embora este tenha sido o primeiro Poliomavirus descrito como possível causador de patologia no homem ⁷, ainda há muita controvérsia sobre este tema. As diferenças genéticas existentes entre os Poliomavirus estão provavelmente associadas a capacidade de infectarem diferentes hospedeiros, possuírem diferentes sítios de infecção e com distintas patologias relacionadas. Inclusive, a capacidade tumorigênica desse vírus deu a ele seu nome, que vem do grego “*poly*” que significa muitos e “*oma*” que significa tumores ⁸.

Os Poliomavirus são vírus relativamente pequenos (aproximadamente 50nm), com seu material genético composto de em média 5k pares de base. Em linhas gerais, o genoma dessa família viral é dividido em 3 regiões denominadas precoce, tardia e região de controle não codificante. A região precoce é formada por duas

proteínas sintetizadas por genes homônimos chamados antígeno T grande (AgT ou LTA_g – do inglês, Large T Antigen) e antígeno T pequeno (Agt ou STA_g – do inglês, *Small T Antigen*). A região tardia é formada por proteínas sintetizadas por genes também homônimos formadores do capsídeo viral chamados de VP1, VP2 e VP3 ⁹. Alguns vírus da família apresentam ainda uma proteína denominada agnoproteína, cuja função ainda não está totalmente elucidada. Além dessas regiões estruturais, os vírus ainda contam com a região de controle não codificante (NCCR) que regula a replicação do DNA e a transcrição do RNA ¹⁰ e sua montagem é feita no núcleo celular ⁵.

O primeiro Poliomavirus descrito foi o Vírus Vacuolizante Símio 40 - SV40 (do inglês, *Simian vacuolating virus 40*), podendo causar tumores em ratos neonatos e hamsters ^{7, 11, 12}. Foi isolado no início da década de 60 a partir de culturas de células de rim de macaco Rhesus, células estas que foram utilizadas para produzir vacinas de poliomielite ⁷. Apesar de inúmeras pessoas terem sido expostas ao SV40 através de vacina contra a poliomielite contaminada, não há evidências que comprovem um aumento na incidência de tumores ou qualquer relação do SV40 a cânceres em indivíduos vacinados ¹³. Por outro lado, alguns dados sugerem que o vírus pode estar envolvido no desenvolvimento de mesoteliomas, sarcomas e ependimomas (tumor originado no epêndima - neuroepitélio que reveste os ventrículos cerebrais e o canal espinal) e ao aparecimento de linfomas não-Hodgkin ^{11, 14-16}.

O BKPyV foi o primeiro Poliomavirus humano isolado. Isso ocorreu em 1971 a partir de um receptor de transplante de rim de origem sudanesa ¹⁷, onde as letras B e K correspondem as iniciais do nome do paciente receptor do órgão. O vírus BKPyV

desenvolve uma infecção subclínica persistente nos rins de indivíduos saudáveis, porém, em indivíduos imunocomprometidos, especialmente submetidos a transplante renal, a reativação do vírus pode desenvolver complicações clínicas tais como nefropatias associadas ao BKPyV – BKVAN, chegando a perda do enxerto no indivíduo transplantado ¹⁸.

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 necrópsias de indivíduos acometidos confirmou as especulações sobre a etiologia viral desta doença ¹⁹. 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, portanto, JCPyV ²⁰.

Inicialmente, a LEMP era considerada uma doença rara associada a pacientes com Leucemia e Linfoma de Hodgkin ²¹. Contudo, com o advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA / AIDS) pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), e antes da disponibilidade de terapia antirretroviral altamente ativa (no inglês, HAART), as infecções por JCPyV com consequente desenvolvimento de LEMP cresceram drasticamente (55-85%) ^{22, 23}, e aproximadamente 5% dos pacientes com HIV desenvolviam LEMP ^{24, 25}. Entretanto, após a introdução da terapia HAART, a incidência de LEMP nesta população diminuiu ²⁶, embora ainda ocorra em certa parcela dos HIV-positivos mesmo sob tratamento. Um estudo realizado no Brasil mostrou que 48,2% de pacientes com AIDS que desenvolveram lesões focais sem efeito de massa tiveram tais lesões provocadas pelo JCPyV ²⁷. Outro estudo

retrospectivo, ainda no Brasil, mostrou que 6% (12/219) dos pacientes com AIDS e doença neurológica desenvolveram LEMP causada pelo JCPyV ²⁸.

Durante décadas (1971-2007), os únicos membros da família Poliomavirus que realmente eram considerados patogênicos ao homem eram os vírus JCPyV e BKPyV. Entretanto, de 2007 até os dias atuais, outros 12 Poliomavirus foram descritos, alguns associados a patologias.

Em 2007, dois Poliomavirus respiratórios foram identificados: por Allander e colaboradores no Instituto Karolinska (KIPyV) e por Gaynor e colaboradores da Universidade de Washington (WUPyV), respectivamente. Ambos os vírus foram encontrados em secreções respiratórias de pacientes com causas não identificadas de pneumonia através da técnica de sequenciamento em profundidade ^{29, 30}. A infecção primária pelos vírus WU e KI pode causar sintomas inespecíficos ou ainda, ser assintomática, e provavelmente ocorre na infância. A maior prevalência de DNA viral em amostras (respiratórias, tecidos linfoides, sangue e urina) de pacientes imunocomprometidos sugere que a imunossupressão pode resultar em maior susceptibilidade ou reativação de KIPyV e WUPyV ³¹. Apesar dos inúmeros estudos de prevalência publicados, pouco se sabe sobre a patogênese de KIPyV e WUPyV, pois nenhum deles está fortemente associado a doença.

Outro Poliomavirus com maior conteúdo de informações descritas é o MCPyV (do inglês, *Merkel-cell carcinoma Poliomavirus*) Poliomavirus. Descrito em 2008, é o agente etiológico de um carcinoma neuroendócrino agressivo que surge a partir das células Merkel. Estas são células sensoriais que se localizam na camada basal da epiderme e o desenvolvimento do tumor ocorre geralmente em indivíduos imunocomprometidos por imunossupressão pós transplante e senescência

imunológica^{32, 33}. No entanto, o vírus também é encontrado na microbiota normal da pele em indivíduos imunocompetentes³⁴.

Em 2010, Schowalter e colaboradores através da técnica de RCA (do inglês, *Rolling Circle Amplification*) identificaram os Poliomavirus 6 e 7 (HPyV6 e HPyV7) em amostras de pele e cabelo de indivíduos saudáveis. Ainda hoje não há um consenso sobre se e qual a patologia que esses vírus causam³⁵. Ainda no mesmo ano, o Poliomavirus TSPyV (ou ainda HPyV8) foi identificado e sequenciado também através da técnica de RCA, a partir de fragmentos de pele lesionada de um indivíduo imunodeprimido pós transplante cardíaco com indícios clínicos de uma raríssima displasia cutânea denominada Tricodisplasia spinulosa³⁶.

O Poliomavirus 9 ou HPyV9, descrito em 2011 em amostra de soro de um indivíduo transplantado renal submetido a imunossupressão³⁷, não possui, até a presente data, relação com patologias. Análises filogenéticas mostram que esse vírus é mais próximo ao Poliomavirus LPV, encontrado em Macaco Verde Africano do que os demais Poliomavirus que infectam humanos.

Três Poliomavirus foram descritos em 2012. O primeiro, Poliomavirus 10 (HPyV10), foi encontrado em amostras de indivíduos com Síndrome de WHIM, onde o paciente apresenta verrugas, hipogamaglobulinemia, infecções e mielocatexia. Embora o vírus tenha sido descrito nesses indivíduos, não foi possível confirmar sua associação a essa síndrome³⁸. O próximo Poliomavirus identificado foi o Malawi Poliomavirus (MWPpyV) através de pirosequenciamento “*shotgun*” em material extraído de amostras de fezes de uma criança em Malawi, país localizado na África Oriental³⁹. E o último, Mexican Poliomavirus (MXPpyV) descrito em 2012, foi descoberto através da técnica de sequenciamento de alto rendimento utilizando o

equipamento Illumina HiSeq em amostras de fezes de crianças com diarreia coletadas na Califórnia, México e Chile ⁴⁰.

Em 2013, foram descritos mais dois Poliomavirus humanos, igualmente não relacionados a doenças: O Poliomavirus 12 (HPyV12), através de PCR genérico para Poliomavirus em uma amostra de biópsia de fígado ⁴¹, e o Saint-Louis Poliomavirus (STLPyV) em amostras de fezes humanas ⁴².

Cronologicamente, o último Poliomavirus descrito foi o New Jersey (NJPyV), identificado em 2014 em uma amostra de biópsia muscular de um indivíduo transplantado de pâncreas que apresentava placas necróticas nas regiões da face, couro cabeludo e mãos, sugerindo assim que o vírus possui tropismo por células do endotélio vascular, possivelmente causando microtromboses ⁴³.

Com a descoberta de tantos novos vírus, foi proposta uma nova nomenclatura taxonômica dos Poliomavirus. O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) propôs vários critérios de classificação para os Poliomavirus, dividindo a família em três gêneros distintos, sendo os *Orthopolyomavirus* e *Wukipolyomavirus* contendo todas as espécies que infectam mamíferos e *Avipolyomavirus* restrito a vírus que infectam aves ². No gênero *Orthopolyomavirus* estão os vírus JCPyV, BKPyV, MCPyV e TSPyV e no gênero *Wukipolyomavirus* estão inclusos os Poliomavirus KIPyV, WUPyV e os Poliomavirus humanos 6, 7 e 9 ². Quatro outros Poliomavirus isolados de humanos, MWPyV, STLPyV, NJPyV e HPyV12 não foram oficialmente classificados, portanto a taxonomia desta família ainda está em curso. Entretanto, no atual relatório oficial ICTV em relação à família *Polyomaviridae*, datado de 2011 (9º relatório), ainda consta apenas um gênero *Polyomavirus* e 13 espécies, das quais 3 são vírus humanos ⁴⁴.

Apesar de, até a presente data, não haver uma nomenclatura oficial, um grupo de estudo específico para a família *Polyomaviridae* do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus subdividiu os Poliomavirus em quatro gêneros baseados na sequência do gene do antígeno T grande (Alfa, Beta, Gama e Deltapolyomavirus), agrupando as 81 das 100 espécies de vírus até então já identificadas; a maioria dos nomes de espécies consistiria no nome binomial das espécies hospedeiras seguido por “poliomavírus” e um número que reflete a ordem da descoberta ³, além disso, estão incluídos 19 polyomavirus que ainda não se expandiram para o processo de classificação ⁴.

Segundo essa nova classificação, os Poliomavirus MCPyV, TSPyV, NJPyV, HPyV9 e HPyV12 seriam classificados como gênero *Alphapolyomavirus*; JCPyV, BKPyV, KIPyV e WUPyV gênero *Betapolyomavirus*, juntamente com o SV-40 e os vírus HPyV6, HPyV7, MWPyV e STLPyV classificados como gênero *Deltapolyomavirus* ⁴.

O modo de transmissão dos Poliomavirus ainda é pouco entendido, contudo, múltiplas rotas de infecção, como urina, saliva e sangue estão possivelmente envolvidas ^{9, 45}.

1.2 VIRUS E CÂNCER

Cerca de 20% dos cânceres humanos são de origem viral ⁴⁶. Entre esses agentes oncogênicos encontram-se os vírus Epstein-Barr (EBV) ⁴⁷, da Hepatite B

(HBV) ⁴⁸, da Hepatite C (HCV) ⁴⁹, do Papiloma Humano (HPV) ⁵⁰, o Linfotrópico da célula T humana (HTLV) ^{51, 52}, o Herpesvírus causador do sarcoma de Kaposi (KSHV) ⁵³, e os Poliomavirus de células Merkel (MCPyV) ³³ e a displasia associada ao poliomavírus Tricodisplasia Spinulosa (TSPyV) ^{36, 54, 55}.

Um importante e muito bem estudado vírus de DNA causador de câncer é o Papilomavirus Humano (HPV) ⁵⁰, podendo causar verrugas cutâneas, epidermodisplasias, condilomas e neoplasias malignas especialmente na região do colo do útero, além de estar relacionado com uma parcela dos casos de câncer na vagina, vulva, ânus, pênis, além de carcinomas da mucosa oral, laríngea e orofaríngea ⁵⁶⁻⁵⁸. Os tipos de HPV que mais contribuem para o câncer cervical são: HPV-16 e 18, que juntos são responsáveis por 70% dos casos, além de serem os mais frequentes a redor do mundo ⁵⁹⁻⁶².

Outro exemplo de vírus que se apresenta epissomal em indivíduos sadios e integrado em indivíduos com câncer é o MCPyV, onde estudos demonstram que há integração clonal do vírus no genoma de pacientes com carcinoma de células Merkel, indicando que o MCPyV participa da patogênese do tumor ^{34, 63}.

Muitos mecanismos moleculares da oncogênese relacionada aos Poliomavirus foram descritos ao longo de décadas de estudo ⁶⁴, entretanto, as informações nesse campo publicadas são escassas. Alguns estudos *in vitro* apoiam o papel oncogênico do AgT e do Agt, onde essas proteínas participariam de certas alterações oncogênicas. Existem alguns relatos de detecção do BKPyV em tumores, como neoplasias uroteliais e doenças malignas tubulares renais, tumores colo retais e cerebrais, linfomas, câncer de pâncreas e de próstata, certos sarcomas e também para melanomas não relacionados com exposição a luz ultravioleta ⁶⁵⁻⁶⁷. A interpretação destes resultados tem sido controversa, mas baseado em evidências

em humanos além de experimentos com modelos animais, a agência internacional da Organização Mundial de Saúde (OMS) e o *International Agency for Research on Cancer* (IARC), classificaram os Poliomavirus humanos BKPyV e JCPyV como possivelmente oncogênicos (Grupo 2B) ⁶⁸.

Apesar das incertezas em relação aos demais poliomavírus humanos com displasias e neoplasias, o TSPyV e MCPyV são os únicos que estão comprovadamente relacionados com a presença de alterações cutâneas. Um dos primeiros trabalhos que investigou a relação do MCPyV com câncer descreveu o DNA deste vírus em 8 de 10 pacientes com carcinoma de células Merkel (MCC), com integração do genoma viral em 5 deles ³³. Outro estudo encontrou o MCPyV em cerca de 80% das amostras de MCC, demonstrando ainda que o AgT aparece frequentemente truncado antes do domínio da helicase ⁶⁹. Ainda, outras sequências também apresentaram deleções da região VP1 ⁷⁰.

O papel do MCPyV no MCC, embora já bem estabelecido, é apoiado ainda pelo fato de que os pacientes com MCC frequentemente apresentam títulos elevadíssimos de anticorpos anti-MCPyV em comparação a população em geral ⁷¹.

Além da óbvia relação do vírus com o tumor de célula Merkel em si, pacientes com MCC têm risco aumentado de desenvolver leucemia linfocítica crônica (LLC) ⁷², ⁷³. Um estudo relatou a presença de DNA de MCPyV em 27,1% de células malignas purificada a partir de amostras de indivíduos com LLC ⁷⁴, no entanto, o efeito causal no LCC ainda não foi comprovado.

O outro Poliomavirus que está intimamente ligado a uma displasia, o TSPyV, associado a doença Tricodisplasia Spinulosa, será detalhado mais adiante nesse trabalho.

1.2.1 INTERAÇÕES PROTEICAS ENTRE OS POLIOMAVÍRUS E O HOSPEDEIRO

A proteína retinoblastoma (pRb ou p105) é um supressor tumoral que desempenha papel fundamental no controle negativo do ciclo celular e na progressão do tumor – no ponto de verificação da fase G1, bloqueando a entrada na fase S e a divisão celular – exercendo um papel anti-proliferativo, além de desempenhar um papel crítico na reparação do DNA ⁷⁵. A inativação da pRb ocorre em várias doenças associadas a poliomavírus, como o carcinoma de células Merkel e a Tricodisplasia Spinulosa associada ao Poliomavirus, entretanto, os antígenos desses Poliomavirus regulam a pRb de forma diferente dos demais vírus associados a câncer ⁷⁶.

A região precoce destes vírus codifica as proteínas transformadoras chamadas antígenos T grande e pequeno (AgT e Agt respectivamente) que estão envolvidos na replicação viral e também na tumorigênese. A ligação do AgT a pRb promove a ativação da família de fatores de transcrição E2 (E2F), composta por 8 genes diferentes – E2F1-7; 3b ⁷⁷ – que induzem a expressão de genes celulares necessários para a entrada na fase S (Giacinti e Giordano, 2006). Essa família de fatores de transcrição hélice-alça-hélice básicos forma complexos hetero-diméricos

com o fator de transcrição DP1 ou o fator de transcrição DP2 (DP, do inglês, “*Dimerization Partner*” ou parceiro na dimerização), e possuem um domínio N-terminal de ligação com o DNA e de dimerização.

Os fatores de transcrição E2F ativados promovem a progressão do ciclo celular, enquanto que os E2Fs “repressores” são considerados necessários para o término do ciclo celular ⁷⁷. O que ocorre é que a pRb liga-se ao fator de transcrição E2F1 impedindo-o de interagir com a maquinaria de transcrição das células. Na ausência de pRb, E2F1 se liga ao DP1 formando o heterodímero E2F-DP, que medeia a transativação de genes alvo E2F1 que facilitam por sua vez a transição G1 / S e a fase S, regulando os genes envolvidos na progressão do ciclo celular ⁷⁸.

Foi observado que além do papel do Agt do TSPyV junto a pRb para a regulação da replicação, o Agt liga-se a proteína Fosfatase 2A (PP2A) e aumenta a fosforilação ocorrendo uma regulação diferencial de pRb ^{76, 78-80}. De fato, o estado de fosforilação de pRb é um determinante importante na patogenia da TS ⁸¹.

De forma semelhante, a expressão celular do Agt do SV40 diminui a desfosforilação de pRb através da ligação com as subunidades A e C da PP2A ⁸² que desempenham um papel direto na modulação do estado de fosforilação de proteínas ao longo do ciclo celular ⁸³.

Através de análises moleculares de TSPyV observou-se a presença de RNA mensageiro do Antígeno T Médio (AgTM, descrito no próximo item deste trabalho), que contém domínios de ligação à proteína correspondentes na membrana das células alvo ⁸⁴. Assim, pode-se dizer que o AgTM do TSPyV junto com o AgT e Agt compartilham certas propriedades tais como a capacidade de regular PP2A e os ter

como alvo a pRb ⁸⁰. Esta interação também pode levar à hiperfosforilação das proteínas “pRb-like” (ou ainda *pocket proteins*, ou proteínas de bolso), proteínas supressoras de tumor como a p107 (pRb-L1) e a p130 (pRb-L2), cuja expressão é detectada nas fases G1 e S ^{85, 86}.

O antígeno Ki-67 está presente em células que estão em divisão celular (fases G1, S, G2 e M do ciclo celular), ausente na célula em repouso (na fase G0) e não detectado durante a fase de reparação de DNA ⁸⁷. Tumores que apresentam menos de 10% de células positivas para esse antígeno têm um baixo índice proliferativo; Entre 10 e 25%, um moderado índice proliferativo; mais de 25% de células positivas, um alto índice proliferativo (indicando, portanto, maior agressividade tumoral) ⁸⁸. Além disso, está associado à transcrição do RNA ribossomal, e sua inativação induz a inibição da síntese de RNA ribossômico ⁸⁹. Também foi observado um aumento substancial de Ki-67 nos núcleos, tanto nos folículos quanto na epiderme de indivíduos confirmados com TS. Na base do folículo, foi evidente um aumento significativo na expressão de Ki-67 quando comparado com a pele de indivíduos saudáveis ⁸¹.

1.3 POLIOMAVIRUS TSPyV

1.3.1 ESTRUTURA GENÔMICA

Após a entrada do vírus na célula os primeiros genes – região precoce – são expressos, codificando as proteínas do antígeno AgT e do Agt. Recentemente foram descritas no TSPyV mais 2 ORFs que codificam 2 novas proteínas, descritas como antígeno T médio (AgTM do inglês, *Middle T Antigen*) e o antígeno T alternativo (AgT-ALTO – do inglês, *Alternative Open Reading frame* – ORF05) ^{84, 90}. Suas sequências começam no mesmo códon de iniciação, mas estão sujeitos a *splicing* alternativo, gerando diferentes produtos. Como resultado, essas proteínas compartilham uma região N-terminal de aproximadamente 80 aminoácidos que contém algumas regiões altamente conservadas e importantes para a replicação do vírus e transformação da célula hospedeira ³⁶.

Assim como os demais Poliomavirus humanos, o TSPyV é um vírus relativamente pequeno, possuindo entre 45 e 50nm, não envelopado e apresenta aproximadamente 5.250 pares de bases em seu DNA de dupla fita circular. Ainda, possui 5 quadros de leitura aberta (ORFs, do inglês *open reading frames*) e assim como em outros Poliomavirus, é dividido em regiões precoce e tardia.

A região denominada tardia codifica as proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3, responsáveis pela cápside viral. O capsídeo é construído por 72 capsômeros pentaméricos com um total de 360 proteínas da cápside em disposição inclinada (T=7) (Figura 1), porém, sua estrutura icosaédrica é a de uma cápside com hexâmeros de pentâmeros, calculado seguindo o sistema de Caspar e de Klug (Figura 2) ⁹¹⁻⁹³. A VP1 é a principal proteína do capsômero viral pentamérico (70% da composição) que incorpora também uma cópia das proteínas VP2 e VP3 para garantir a encapsidação viral ⁹⁴.

Figura 1 – Representação física dos Poliomavirus, demonstrando o arranjo interno (lado esquerdo) e a disposição inclinada das proteínas no capsídeo viral (lado direito). Ref. Instituto Suíço de Bioinformática (2010) adaptado.

Figura 2 - O número de triangulação do Icosaedro é calculado seguindo o sistema de Caspar e Klug ⁹¹ e sua estrutura icosaédrica é a de uma cápside T = 7, com hexâmeros de pentâmeros, adaptado.

Sorologicamente, a VP1 é considerada a proteína imunodominante dos Poliomavirus, e, por conseguinte o TSPyV-VP1 representa possivelmente o antígeno mais importante na medição da reatividade contra o antígeno TSPyV ⁹⁵.

A proteína AgT funciona como um *switch*, interagindo com proteínas celulares, tais como a p53 e a proteína do retinoblastoma, regulando do início até o final da transcrição de proteínas virais e a replicação do genoma viral, porém, seu papel na tumorigênese ainda não foi elucidado ⁹⁶. As proteínas do AgTM e AgT-ALTO estão aparentemente associadas a interação do vírus com proteínas celulares ligadas a transformação celular, pois estas foram observadas no núcleo (AgTM) e no citoplasma celular (AgT-ALTO) ⁸⁴. É interessante notar que até a presente data, nenhum dos Poliomavirus humanos demonstrou expressar o AgTM, que é considerada a oncoproteína viral mais importante dentre os Poliomavirus que infectam roedores ^{97, 98}.

Entre as duas regiões precoce e tardia, se encontra a “região de controle não codificante” (do inglês, *Non-Coding Control Region* ou ainda NCCR). No JCPyV, um dos mais estudados da família *Polyomaviridae*, modificações na região NCCR estão associadas com um aumento na transcrição e replicação viral em pacientes com LEMP. A NCCR contém a origem de replicação, a região denominada TATA-box, que vai se ligar a cofatores eucarióticos, os locais de ligação do antígeno T grande, fatores de transcrição celulares e um promotor bidirecional. Ela também contém os elementos promotores que controlam a transcrição de das regiões precoce e tardia ^{99, 100}.

Diferentemente dos JCPyV, BKPyV e SV40, nenhum outro vírus da família *Polyomaviridae* com capacidade de infectar o homem – incluindo o TSPyV- possui o

gene para agnoproteína, cujo papel está associado tanto a sustentar o ciclo de vida produtivo dos vírus ¹⁰¹, como também ao seu papel oncogênico, aumentando a taxa de erro de replicação e diminuindo, portanto, a reparação do DNA. Ainda, essa proteína parece facilitar a disseminação do vírus interagindo com a célula promovendo a apoptose ¹⁰².

1.3.2 TRICODISPLASIA SPINULOSA (TS)

TS é uma doença de pele rara, descrita pela primeira vez em 1995 como efeito colateral cutâneo da utilização de ciclosporina, fármaco da classe dos inibidores de calcineurina cuja ação é suprimir as reações imunológicas que causam rejeição de órgãos transplantados ^{103, 104}. Em 1999, foi demonstrada a presença de partículas virais em amostras de biópsia de lesões, sugerindo, portanto, a etiologia infecciosa da doença. Assim, a TS foi descrita por completo e o termo "Tricodisplasia spinulosa" foi definido para tal ¹⁰⁵. Mais tarde, foram confirmados por outros grupos os achados histológicos típicos em hiperplasias de bulbos capilares e a presença de poliomavírus ^{54, 106}. A presença de TSPyV em lesões foi confirmada em indivíduos da Europa Ocidental, América do Norte, Austrália ^{55, 107, 108} e mais recentemente, o vírus foi identificado em um paciente com TS no Brasil pelo nosso grupo ¹⁰⁹.

Em suma, a TS é uma doença infecciosa, cujo agente é o TSPyV e caracterizada pelo desenvolvimento de pápulas foliculares e espinhas de queratina conhecidos como espículas, que normalmente se manifestam na região facial do paciente e extremidades do corpo ^{36, 105, 110}. A TS apresenta um padrão

homogêneo entre os pacientes afetados, demonstrando também dilatação do folículo piloso, queratose actínica (constantemente confundida com danos por exposição prolongada ao sol) e entupimento do infundíbulo (Figura 3). Em indivíduos com alopecia, as lesões podem aparecer nas papilas dérmicas e cílios. Além disso, fazem parte dos principais sintomas a proliferação de células anormais e aumento de eosinófilos contendo grânulos irregulares ^{105, 111-113}.

Conforme a doença progride, na região das sobrancelhas, orelhas e nariz a pele fica visualmente mais grossa, causando desfiguração da aparência facial em combinação com as espículas faciais ¹¹³. Fischer e colegas revisaram os achados clínico, histopatológico, estrutural e dados moleculares de 25 casos de TS. A faixa etária no momento do diagnóstico compreendeu de 5 a 70 anos, com 13 pacientes do sexo masculino e 12 pacientes do sexo feminino. Os achados clínicos foram semelhantes em todos os grupos raciais e étnicos representados e todos os pacientes apresentaram pápulas foliculares na região central da face, seguido com apresentação frequente de pápulas pelas extremidades e pouco frequente no couro cabeludo. A maioria dos pacientes demonstrou espinhos saindo de algumas pápulas, geralmente assintomáticos em quase dois terços dos casos, enquanto outros indivíduos apresentam leve prurido ¹⁰⁷.

Figura 3 – Paciente no momento da suspeita de TS. As pápulas foliculares espinhosas na face e o espessamento da pele e alopecia das sobrancelhas, levando à distorção do rosto e à aparência leonina. Fonte: Própria.

No presente momento, informações a respeito dos mecanismos de patogênese, transmissão viral e outras consequências da infecção pelo TSPyV ainda não foram totalmente esclarecidas^{36, 106, 112}. Até agora, a TS já fora observada em pacientes submetidos a transplantes de órgãos sólidos e mais raramente em pacientes com leucemia linfocítica crônica e aguda^{111, 112}.

1.4 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A distribuição e prevalência do TSPyV tem sido estudada por vários grupos que buscaram a presença do vírus em materiais biológicos como *swabs* e biópsias de pele, pelos da sobrancelha, soro/plasma e urina em indivíduos assintomáticos para TS, independentemente do seu estado imunológico. A presença do DNA viral foi vista em menos de 5% das amostras estudadas ¹¹⁴. A prevalência elevadíssima do TSPyV, beirando os 85-95%, e elevadas cargas virais, foram reportadas apenas em pacientes diagnosticados com TS ¹⁰⁸. Até a realização do presente projeto, o DNA de TSPyV não havia sido detectado no sangue, mesmo de indivíduos com TS. Nosso grupo, como descrito em maiores detalhes mais adiante nos resultados desta tese, descreveu pela primeira vez a presença do DNA viral no sangue de indivíduos com imunossupressão, com e sem a doença ¹¹⁵.

A presença de anticorpos do tipo IgG genéricos anti-VP1 para HPyVs cutâneos foi analisada por meio de ensaio imunoenzimático baseado na tecnologia *Luminex* na população geral. A soroprevalência de anticorpos anti-TSPyV foi alta (>70%) em indivíduos após 2 anos de idade, diminuindo em indivíduos com mais de 50 anos ⁹⁵, de forma similar ao que se observa com o Poliomavirus JCPyV e BKPyV ¹¹⁶⁻¹¹⁹. Por outro lado, a prevalência dos anticorpos anti-MCPyV, anti-HPyV6 e anti-HPyV7 permaneceu relativamente estável em todas as faixas etárias ¹²⁰. Esses resultados parecem indicar que as infecções por esses Poliomavirus são em geral frequentes e ocorrem em idade precoce. Chen e colaboradores demonstraram através de sorologia e PCR que as infecções primárias por TSPyV e MCPyV parecem ser assintomáticas na infância ¹²¹.

Outros estudos sorológicos sobre a prevalência do TSPyV foram realizados de forma independente. Com um total de 528 indivíduos holandeses e 149 indivíduos finlandeses, todos saudáveis, cerca de 70% de soroprevalência foi encontrada. Em relação as faixas etárias, foi observado um aumento de 41% para 75% em adultos a partir dos 30 anos de idade em relação a crianças de 0-9 anos ^{95, 122}. Embora a prevalência em populações sadias não seja baixa (70%), pode chegar a 89% em indivíduos submetidos a imunossupressão por transplante renal ⁹⁵. Esse aumento na soroprevalência de anticorpos anti-TSPyV pós tratamento imunossupressor, entretanto, é uma incógnita.

Wieland e colaboradores buscaram o DNA viral dos Poliomavirus HPyV6, HPyV7, TSPyV, HPyV9 e HPyV10 em 449 amostras cutâneas, da região da face de homens infectados pelo HIV e de controles não infectados do sexo masculino. Os Poliomavirus HPyV6, HPyV7, TSPyV e HPyV10 foram encontrados significativamente mais frequentemente na pele de infectados pelo HIV do que de indivíduos soronegativos. O Poliomavirus HPyV9 não foi detectado em nenhuma das coortes. Em conclusão, o estudo sugere que os Poliomavirus HPyV6, 7, 10 e TSPyV parecem ser parte regular da microbiota da pele humana, sendo os imunodeprimidos mais susceptíveis ¹²³.

Já é possível deduzir com as informações acumuladas que, em algum momento da vida dos indivíduos, provavelmente ainda durante a infância, estes entram em contato com certos Poliomavirus, incluindo o TSPyV. A doença se manifesta em uma minoria de pacientes imunodeficientes, e ainda não se sabe como é a forma de transmissão do vírus.

O que permanece desconhecido também é se a TS é uma manifestação proveniente da reativação do poliomavírus TSPyV que se encontrava dormente em um reservatório ainda não identificado em indivíduos imunodeprimidos ou se a doença pode também ser fruto de uma infecção primária, oportunista, que se manifesta em indivíduos sob imunossupressão. Em suma, os dados soroepidemiológicos indicam que a infecção por TSPyV é comum e ocorre principalmente em crianças e jovens, com queda nos níveis de anticorpos em fases posteriores da vida.

1.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE ESTE ESTUDO

O início desse estudo deu-se em 2013 a partir de um caso suspeito (Figura 3, item 1.3), mas ainda sem diagnóstico de TS, visto que não existiam testes disponíveis para essa enfermidade no Brasil. A suspeita de TS era fundamentada na presença de espículas na região facial central da paciente, semelhante as presentes no desenvolvimento clássico de TS descrito na literatura. Amostras de sangue, urina, espículas da região facial e biópsia de pele chegaram ao laboratório de virologia do Instituto de Medicina Tropical – IMTUSP, encaminhadas pela Unidade de Transplante Renal (UTR) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), oriundas da paciente com imunossupressão causada pelo tratamento realizado afim de evitar a rejeição no transplante renal. Por se tratar de um caso de urgência de uma paciente com quadro deficiência imunológica, o caminho mais rápido foi utilizar a metodologia de

sequenciamento direto utilizando a plataforma de sequenciamento de nova geração PGM (do inglês, *Personal Genome Machine*) *Ion Torrent*. Nosso grupo já possuía alguma experiência com sequenciamento de vírus e análise de dados oriundos dessa plataforma.

Assumindo que poderia se tratar, de um agente etiológico viral, com DNA no genoma, protocolos para eliminação de DNA humano foram aplicados, e métodos voltados a extração de DNA viral e preparação do mesmo para o sequenciamento direto sem amplificação prévia foram adotados. Após o sequenciamento na plataforma PGM *Ion Torrent* e análise das leituras geradas utilizando a metodologia de montagem “denovo”, foi obtido um consenso de uma sequência única (Figura 4).

Figura 4 - Montagem das sequências geradas utilizando a ferramenta de montagem “denovo” no programa de análises CLC *Genomics Workbench*, mostrando a formação de uma sequência única de 5.23 kbases.

O resultado desse procedimento, portanto, resultou em uma sequência de 5235 pares de bases, onde, após ser analisada e comparada ao banco mundial de dados de sequências (*GenBank*) com a ferramenta *Blast*, apresentou 99% de similaridade com outras sequências de TSPyV, fechando o diagnóstico da paciente e gerando a primeira publicação do grupo nesse tema (Publicação 8 na lista de publicações).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Apesar do imenso volume de dados disponíveis sobre diversos vírus da família *Polyomaviridae*, ainda são escassas as informações disponíveis sobre o TSPyV, mesmo tendo sido descoberto em 2010. Enquanto já se sabe muito sobre a transmissão, prevalência e excreção dos BKPyV, JCPyV e MCPyV, nada ou muito pouco está disponível sobre o TSPyV, mesmo este vírus sendo tão importante para indivíduos imunodeprimidos como os demais vírus desta família.

Após o primeiro relato desse vírus, em 2010 até o momento da redação deste texto, foram publicados 85 artigos indexados na base de dados do *Pubmed* sobre o assunto, sendo que desses, 36 artigos são relatos de caso; 7 descrevem dados soropidemiológicos; 15 descrevem dados relacionados a parte molecular; e 27 sobre outros assuntos ligados a TSPyV e TS. Estratificando pelos anos de publicação, em 2010 foram publicados 2 artigos, de 2011 a 2013 em média 8 artigos / ano, de 2014 a 2015, 17 artigos / ano, e em 2016 e 2017, 12 artigos / ano. Isso mostra que em pouco mais de 7 anos, uma doença antes considerada extremamente rara, hoje em dia é diagnosticada com mais frequência, vide o número de relatos de caso. Em 2014, publicamos nosso primeiro artigo sobre TSPyV (Artigo 8, na lista de artigos) demonstrando a presença do vírus causando a doença em nosso meio.

Entretanto, apesar do evidente aumento de informação clínica e científica sobre o TSPyV e a TS acumulado nos últimos anos, não há até o momento testes comerciais, sorológicos ou moleculares, tampouco um modelo de cultura *in vitro* para o entendimento e detecção do TSPyV em centros de transplante, unidades de

tratamentos de indivíduos imunossuprimidos, ou mesmo em laboratórios de análises clínicas. Somente testes *in-house* desenvolvidos em laboratórios de pesquisa são utilizados para a detecção desse patógeno. Isso mostra a carência de estudos voltados a este vírus, em particular no desenvolvimento e padronização de métodos de detecção e modelos de cultivo, bem como pesquisas relacionadas a prevalência, vias de transmissão, comportamento (latência/excreção) e genética viral.

Portanto, tendo em vista a total ausência de dados em nível nacional, e os poucos relatos no mundo considerando já os 8 anos desde sua descoberta, o presente estudo se propôs a responder algumas destas perguntas.

OBJETIVOS DO ESTUDO

3. OBJETIVOS DO ESTUDO

3.1 OBJETIVO GERAL

Através do estudo de amostras biológicas humanas e amostras de água coletadas em um Rio em Caxias do Sul, este projeto teve como objetivo central aumentar o conhecimento disponível sobre o TSPyV com ênfase em sua prevalência, vias de transmissão, características genéticas e desenvolvimento de métodos de diagnóstico molecular e sequenciamento.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar a dinâmica de excreção urinária do TSPyV em amostras consecutivas de indivíduos imunodeprimidos receptores de rim;
2. Investigar possíveis vias de transmissão do TSPyV através da análise de: pares de leite materno e saliva de recém-nascidos; e de amostras de água coletadas em diferentes pontos do Rio Belo em Caxias do Sul;

3. Caracterizar a diversidade genética e classificar filogeneticamente os TSPyV encontrados nesse estudo;
4. Identificar possíveis mutações envolvidas no desenvolvimento da doença;
5. Estabelecer um modelo de cultura celular para o TSPyV

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Este trabalho utilizou mais de um grupo de amostras (diferentes coortes) para responder aos objetivos propostos. Portanto, o delineamento do estudo será descrito de acordo com cada conjunto de amostra. Ainda, deste ponto em diante, todas as descrições serão estratificadas de acordo com a coorte/tipo de amostra utilizada.

1. Estudo de coorte transversal onde foram avaliadas a prevalência de virúria, viremia, a dinâmica de excreção, além de análises moleculares do TSPyV em pacientes submetidos a transplante renal na Unidade de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e de indivíduos saudáveis trabalhadores do "quadrilátero da saúde" da FMUSP. Após a inclusão, os pacientes foram acompanhados com coletas bimestrais de urina durante 6 meses subsequentes a entrada no estudo, totalizando 3 coletas.

O número de amostras dos indivíduos saudáveis foi definido com base em artigos já publicados sobre o tema, onde a prevalência média de excreção urinária do BKPyV em imunocompetentes é de 15%, sendo de 7% o menor resultado esperado e aceitável com intervalo de confiança de 95%. Estimando-se ainda uma perda de 10-20% dos indivíduos até o final do estudo, o N determinado foi de 71 indivíduos. Essa base de cálculo estatístico foi feita sobre os dados do BKPyV, pois a prevalência do JCPyV é superior, o que levaria a um número amostral mais baixo.

Toda a análise estatística foi realizada recorrendo ao programa SPSS 20.0 para Windows (IBM®) e todos os indivíduos foram selecionados no estudo por conveniência (amostras coletadas em estudos anteriores).

As amostras de indivíduos transplantados renal são oriundas de um projeto maior e selecionadas para esse estudo de acordo com a disponibilidade de amostras de sangue coletadas bimestralmente (6 amostras) durante 12 meses e por número de amostras de urina coletadas bimestralmente (6 amostras) durante 12 meses.

2. A fim de identificar uma possível fonte de transmissão do Poliomavirus TS, foram analisadas 52 amostras, provenientes do Arroio Belo, que drena 21% do perímetro urbano do município de Caxias do Sul – RS, oriundas de parceria estabelecida com a Dra. Suelen Paesi, Coordenadora do Laboratório de Diagnóstico Molecular do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul. As amostras de água de Caxias do Sul foram coletadas durante o período de Março de 2015 a Março de 2016, mensalmente, em quatro pontos distintos do rio.

3. Com o intuito de averiguar a possível transmissão vertical do TSPyV, foram selecionadas randomicamente (selecionadas ao acaso no bio-repositório) amostras de leite materno e urina de 95 mães saudáveis e saliva dos 95 respectivos recém-nascidos, armazenados em um bio-repositório do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP - USP (Projeto aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP, nº 1.464.831).

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

Os indivíduos receptores de rim e indivíduos saudáveis incluídos atenderam aos pré-requisitos necessários definidos nos projetos anteriores e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

O critério de inclusão das mães/gestantes para esse estudo foi estar gestante (pré-natal) no período de coleta da amostra inicial de urina, seus recém-nascidos nascerem vivos e terem sido amamentados.

A utilização das amostras provenientes dos diferentes estudos descritos acima para uma abordagem específica sobre TSPyV foi registrado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP aprovado com o número 513.805 (Anexo 1). O uso das amostras de indivíduos submetidos a transplante renal foi aprovado pela mesma Comissão de Ética e registrado com o protocolo de pesquisa número 0569/2011 (Anexo 2), oriundas de um projeto maior intitulado “Infecção pelos Poliomavirus 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 3). A utilização de amostras de indivíduos saudáveis também foi aprovada pela mesma comissão sob protocolo de pesquisa # 0032/2011 (Anexo 4).

O uso das amostras de leite materno e urina das mães, e salivas dos recém-nascidos provenientes do bio-repositório da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP-USP, foram aprovadas pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, com o parecer número 1.464.831 (Anexo

5), e previamente aprovadas pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

4.3 ORIGEM DAS AMOSTRAS

Uma vez que utilizamos mais de um tipo de amostra, advindas de grupos diferentes, cada grupo com seu respectivo material amostral será detalhado abaixo.

1. As amostras de urina dos indivíduos imunocompetentes e dos imunodeprimidos submetidos a transplante renal foram coletadas em projetos anteriores que visaram identificar os Poliomavirus JCPyV e BKPyV, utilizando frasco estéril de 5 mL.

2. As amostras de leite materno e urina provenientes das mães imunocompetentes e saliva provenientes dos recém-nascidos são oriundas do biorepositório de amostras do departamento de pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP – USP sob responsabilidade da Dra. Aparecida Yamamoto. Essas amostras foram inicialmente obtidas para um projeto cujo objetivo foi estudar a incidência e fatores predisponentes para a infecção pelo Citomegalovirus (CMV) em gestantes e recém-nascidos sob coordenação da Dra. Yamamoto.

3. As amostras de água foram coletadas em quatro pontos ao longo do Arroio Belo no município de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil (Figura 5).

O primeiro ponto de coleta está localizado dentro da área urbana de Caxias do Sul, recebe efluentes de origem doméstica e está acima da liberação de dejetos de uma indústria de processamento de animais. Consiste no ponto de avaliação da qualidade de um fluxo antes da contribuição do rejeito industrial.

O segundo ponto está localizado na região urbana, é um ponto estabelecido para monitorar a qualidade do rio Belo após receber material proveniente da indústria.

O próximo ponto está localizado abaixo dos pontos supracitados e posterior a junção ao tronco principal do rio, em área periurbana, caracterizada por vegetação nativa e atividades agrícolas. Esta região recebe efluentes domésticos.

O ultimo ponto de coleta está localizado após uma estação de tratamento de esgoto. Compreende o ponto mais distante da área urbanizada a montante da bacia do rio Belo. É caracterizada por áreas de vegetação nativa e atividades agrícolas além de ser usada para recreação.

Figura 5 - Localização dos pontos de coleta no Arroio Belo (Cortesia de Viviane Girardi, Universidade Feevale, Rio Grande do Sul, Brasil)

No total foram coletadas 52 amostras, sendo 4 pontos e 13 amostras por ponto. Um volume de 500 mL de água superficial foi coletado em frascos estéreis.

4.4 CONSTRUÇÃO DO CONTROLE POSITIVO PARA OS TESTES MOLECULARES

Para que pudéssemos contar com um controle positivo de TSPyV quantificado, um plasmídeo nomeado TSMCV contendo um fragmento de aproximadamente 300pb da região do antígeno T grande do TSPyV (região mais conservada entre os demais Poliomavirus) e um fragmento de aproximadamente 250pb da região do antígeno T grande do MCPyV, ligado ao vetor pUC57, foi sintetizado e clonado em bactéria pela empresa *GenScript* (Piscataway, NJ, EUA). Esse controle é sintetizado na China, de onde é encaminhado liofilizado para sua utilização. No nosso caso, esse plasmídeo foi útil como controle positivo qualitativo, quantitativo e para determinar a sensibilidade dos ensaios (figura 6).

Figura 6. Plasmídeo pUC57 com a inserção da sequência alvo confirmada via enzima de restrição Xba1 e BamH1.

Para calcular a quantidade de cópias de plasmídeo utilizamos a seguinte fórmula: Peso em Daltons (g / mol) = (tamanho pb do plasmídeo + inserção). Onde no nosso caso $\rightarrow (3291 \text{ pb})(330 \text{ Da} \times 2 \text{ nucleotídeos / pb}) = 2.172.060 \text{ g / mol}$

Assim: (g / mol) / número de Avogadro $6,02214199 \times 10^{23}$ =

g / molécula = número de cópias

$(2172060 \text{ g/mol} / \text{número de Avogadro } 6,02214199 \times 10^{23}) = 3,60 \times 10^{-18} \text{ g / molécula.}$

A concentração de plasmídeo (g / μL) / número de cópias

$(4 \text{ ng / mL}) / (3,60 \times 10^{-18} \text{ grams / moléculas}) =$

Totalizando $1,13 \times 10^{12}$ cópias por microlitro de plasmídeo

A mesma fórmula foi confirmada utilizando o endereço eletrônico <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>, onde colocamos quantidade de DNA em nanogramas (ng) e o tamanho do nosso *template* (plasmídeo + inserção), gerando assim a quantidade de cópias.

Esse plasmídeo foi utilizado para batizar (*spyked*) uma amostra de urina (utilizada como *template* das reações) sabidamente negativa para TSPyV, afim de padronizar os testes de padronizações moleculares. Uma alíquota de 1mL de urina foi batizada com 1.13E+11 cópias de plasmídeo pré-extração.

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS UTILIZADAS

1. O DNA total das amostras de indivíduos submetidos a transplante renal e de indivíduos sadios foi extraído utilizando kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Inc., Venlo, Netherlands) conforme instruções do fabricante.

2. As amostras de água oriundas de Caxias do Sul foram concentradas utilizando protocolo de ultracentrifugação previamente estabelecido por Ruskowski e colaboradores ¹²⁴, e o material genético foi extraído utilizando o kit comercial BioPur®, conforme instruções descritas pelo fabricante. O processamento das amostras foi realizado pela aluna de doutorado Viviane Girardi no laboratório de Diagnóstico Molecular do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul e uma alíquota foi cedida para realização desse estudo.

3. As amostras de DNA de leite e urina das mães e saliva dos neonatos são oriundas do bio-repositório da Faculdade de medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). As amostras de saliva foram coletadas com *swab* e acondicionadas em meio de transporte (aproximadamente 200 microlitros). Para realização das PCR, as amostras de saliva passaram por uma etapa prévia de aquecimento a 94°C por 6

minutos, seguida de resfriamento em gelo por 10 minutos para a liberação do material genético (pelo fato de o volume de saliva ser pequeno, optou-se por essa metodologia). O DNA total das amostras de urina e leite materno foram extraídos utilizando o kit comercial *Purelink Genomic DNA* (Invitrogen®).

Todas as amostras foram aliquotadas e armazenadas no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical, IMT-USP, em *freezers* -20°C

4.6 DESENHO DOS *PRIMERS* PARA AS REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

O desenho dos pares de *primers* para a metodologia de PCR convencional e PCR em tempo real (qPCR) utilizando a metodologia SyBR Green® foi realizado através do *software online* Primer3, a partir da sequência consenso obtida através do alinhamento múltiplo de sequências referência da região do AgT do Poliomavirus TSPyV disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) descrito na tabela 1. A verificação visual do alinhamento permitiu localizar a região mais conservada para o desenho dos *primers*. Análises de similaridade foram feitas utilizando a ferramenta online *Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), a fim de evitar que o emparelhamento dos *primers* escolhidos ocorresse também em regiões não específicas. Isso poderia permitir inadvertidamente a amplificação do DNA de outros Poliomavirus ou até mesmo de outros organismos.

O par de oligonucleotídeos e a sonda empregada na qPCR utilizando a metodologia TaqMan foram desenhados através do *software* RealTimeDesign (RTD®) (Biosearch Technologies) (Tabela 2), utilizando como base a sequência do DNA registrado no GenBank sob número KM007161 ¹⁰⁹.

Com a finalidade de sequenciar o genoma completo do TSPyV tanto em plataforma Sanger, quanto em plataformas NGS, foi desenvolvido um método específico e eficaz que utiliza um conjunto de 10 pares de *primers* que amplificam fragmentos de 530 a 850 nucleotídeos com sobreposições entre si, nomeados como “*Short PCR*” e dois pares de *primers* sobrepostos para realizar ensaios de PCR longos que geram fragmentos de 3.497 e 2.024 nucleotídeos respectivamente, nomeados como “*Long PCR*” ¹¹⁵. Esses *primers* foram desenhados utilizando o programa *Primer3* (Tabela 3 e 4; Figura 7).

Tabela 1 - *Primers* utilizados nas reações de qPCR com metodologia SyBR e PCR convencional utilizando o software *Primer3*.

<i>Primer</i>	Sequência	Coordenadas iniciais*	Tamanho do fragmento
TSPyVa_F	CCT GCA TGG TGT CAA ACA AG	4273	350
TSPyVa_R	TGT GCA TGG TTT GGA GAA GA	4623	
TSPyVb_F	TCC TCC CAG GAA ATT CAT CA	3152	298
TSPyVb_R	TGG TGA TGG CAA AAC AGA GA	3450	

* Coordenadas de referência baseadas na sequência JQ723730 do *GenBank*

As regiões conservadas para ancorar os *primers* foram escolhidas com base no consenso obtido por alinhamento múltiplo de sequências de referência de TSPyV disponíveis no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov) (AB873001, KM007161, JQ723730, KU221329 e NC_014361). A análise de similaridade foi feita usando a ferramenta *Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para assegurar que os *primers* não se ligassem a outros poliomavírus ou a outros organismos.

Tabela 2 - *Primers* utilizados na reação de qPCR utilizando o software RTD®.

<i>Primer</i> e Sonda	Sequência	Coordenadas iniciais*	Tamanho do fragmento
TSPyVqP_F	TGGTGGATTCATGGCAGAAGAG	4239	83pb
TSPyVqP_R	GCTGGTGGGAAAGCTTCAATC	4322	
TSPyV_Sonda	FAM TCTGGGTCCTGCATGGTGTCAAA BHQ	4262	

* Coordenadas de referência baseadas na sequência KM007161 do *GeBbank*

Tabela 3 - *Primers* utilizados para a reação de PCR convencional de fragmentos curtos (*Short PCR*) e sequenciamento por Sanger.

<i>Primer</i>	Sequências	Coordenadas iniciais*	Tamanho do fragmento
	<i>Short PCR</i>		
TSV_PA1_F	TTCCAATTAACCACAGGCTT	3666	670
TSV_PA1_R	AGATATACCTCCCTATGGGC		
TSV_PA2_F	CCTGCATGGTGTCAAACAAG	4269	625
TSV_PA2_R	ACCATCCAGATAAAGGAGGA		
TSV_PA3_F	CCTCAGCCTCCTGGTAATA	2	544
TSV_PA3_R	CAGATAGGCCTTCAACTGTC		
TSV_PA4_F	AAATGGGAGGAGTAATCAGC	405	855
TSV_PA4_R	CCATACAATCCCAGTACCAG		
TSV_PA5_F	TGAGGCTGCCACAGATGAAT	1149	641
TSV_PA5_R	ACCCACTGCAAACATATGGA		
TSV_PA6_F	GTTGGAAACTCTTGTCTTGC	4811	620
TSV_PA6_R	TCCTCAGGATAACGGTCTTA		
TSV_PA7_F	CCCACTATTGATTGGTCCTC	3194	534
TSV_PA7_R	TTAAGCTACTGGAGGAAAGC		

TSV_PA8_F	AATTGGACAGTACCAAACCA	2732	605
TSV_PA8_R	ATTCTTCAGTATATGGCGGG		
TSV_PA9_F	CACCTCCAGTTTTGCAATTT	2020	805
TSV_PA9_R	ATCTTGCCTTCAGGTTAGTG		
TSV_PA10_F	CCCATGTTGAATGAGGACC	1608	575
TSV_PA10_R	CCTAGGTAGGCCTCTGTATT		

* Coordenadas de referência baseadas na sequência KM007161 do *GenBank*

Tabela 4 - *Primers* utilizados para a reação de PCR convencional de fragmentos grandes (*Long PCR*) e sequenciamento de nova geração.

<i>Primer</i>	Sequências	Coordenadas	Tamanho
	Long PCR	iniciais*	do fragmento
TSV_T1F	TGAGGCTGCCACAGATGAAT	1144	3497
TSV_T1R	AAGCAAATGCACCAGAAGAAG		
TSV_T2F	CCAAAGGGAATCCAAGCAAT	4498	2024
TSV_T2R	CCCAGTACCAGAGGCAACAT		

* Coordenadas de referência baseadas na sequência KM007161 do *GenBank*

Figura 7 – Ilustração evidenciando os *primers* desenhados neste estudo para o sequenciamento do genoma completo do TSPyV. As linhas (setas) pontilhadas vermelhas e verdes representam os *primers* das reações "Long PCR" e as setas de diversas cores no desenho descritas como F1 a F10 (*forward*) e R1 a R10 (*reverse*) das reações "Short PCR". Note que cada cor corresponde a um par de *primer*.

4.7 PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS MOLECULARES

4.7.1 Padronização da PCR Convencional.

A metodologia de PCR convencional é uma reação qualitativa ¹²⁵ utilizadas para detecção do TSPyV foram padronizadas e otimizadas utilizando três concentrações diferentes de *primers*: 0,05 μ M, 0,1 μ M e 0,2 μ M; três temperaturas de reação diferentes: 58°C, 55°C e 51°C; e três concentrações diferentes de Deoxirribonucleotídeo Trifosfato (dNTPs): 0,8 mM, 1 mM e 1,6 mM. As concentrações dos reagentes utilizados para todas as PCRs foram: tampão 1X (50 mM de KCl, 10 mM de tris), dNTPs nas concentrações definidas na padronização, *primer* na concentração final conforme padronização de cada par, Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) 1,5 mM e Taq Polimerase 1 U / reação, além de utilizar como material a diluição da urina batizada com plasmídeo, descrita anteriormente (*spiked*).

4.7.2 PCR em tempo real (qPCR)

A metodologia de qPCR possibilita a detecção e quantificação do produto amplificado à medida que a reação vai acontecendo por intermédio da separação de fluoróforo-*quencher* ou através da utilização de reagente intercalante em um

equipamento que faz a detecção de fluorescência ¹²⁶. A partir de uma curva pré-estabelecida, o *software* do sistema correlaciona a intensidade do sinal emitido pelas amostras da curva durante os ciclos com a quantidade de amplificado formado nas amostras positivas e quantificadas ¹²⁷.

4.7.2.1 Padronização da qPCR Utilizando a Metodologia TaqMan

O protocolo escolhido como base para a reação de qPCR foi descrito por Pal e colaboradores (2006) que utilizou *primers* e sondas específicas para o gene que codifica o Ag-T dos poliomavírus JCPyV e BKPyV.

A sonda desenhada para a reação foi marcada com FAM (6-*carboxyfluorescein*) como *reporter* na porção terminal 5' e com BHQ-1 (Black Hole Quencher 480-580nm) como *quencher* na porção 3'. A reação foi padronizada e otimizada utilizando três concentrações diferentes de *primers* e sondas combinadas entre si: 0,125 µM, 0,25 µM e 0,5 µM; três temperaturas de reação diferentes: 58°C, 55°C e 51°C.

4.7.2.2 Padronização da qPCR Utilizando a Metodologia SyBR

Green

Foi utilizado como protocolo base o *mix* de reagentes sugerido no protocolo do *mix* TaqMan Invitrogen® adaptado. Em substituição ao *mix* de TaqMan, utilizamos o *MasterMix* contendo o marcador *SYBR Green*. A reação foi padronizada e otimizada utilizando três concentrações diferentes de *primers*: 0,125 μ M, 0,25 μ M e 0,5 μ M; três temperaturas de reação diferentes: 58°C, 55°C e 51°C; adição da enzima *Taq Platinum* polimerase nas concentrações 1 U, 2 U, e 2,5 U, além dos testes sem adição da enzima.

Além das concentrações variadas dos reagentes, foi também padronizada a ciclagem das reações, variando o número de ciclos entre 40 e 60 (+5 ciclos por teste). Foi considerado como ideal o melhor resultado avaliando as concentrações de *primers* / sonda *versus* a quantidade de ciclos que correspondeu ao menor valor de Ct e a maior medida de fluorescência (ΔRn).

4.7.3 Determinação da sensibilidade analítica de qPCR

Com o objetivo de determinar a sensibilidade analítica das qPCR, diluições seriadas do plasmídeo descrito nesse trabalho foram submetidas a dois testes: teste de *Probit* – que consiste em repetir o mesmo ponto de diluição do plasmídeo 10 vezes na mesma reação (decaplicata) para verificar o menor valor positivo reprodutível em mais de 50% das reações; e o teste *Probit* em *spiked*, que consiste em selecionar uma amostra sabidamente negativa e batizar a mesma com o plasmídeo antes da extração de DNA, com a finalidade de reproduzir o que acontece com as amostras clínicas testadas.

Além disso, um teste adicional foi realizado para determinar o limite de detecção (*cut-off*) da amostra negativa, chamado LOB (*Limit of Blank*) – utilizado para determinar a menor quantidade de ruído e o ponto em que ele é detectado quando são testadas réplicas de amostra que não contém o DNA alvo, visto que mesmo sem amplificar o DNA, por conta dos reagentes presentes na qPCR, o *well* negativo em questão emite um sinal fraco de fluorescência que observamos como um ruído na reação.

Foram utilizadas amostras sabidamente negativas, amostras de água e / ou *wells* sem amostra com o objetivo de delimitar os limites reais de detecção do ruído das amostras sem o DNA alvo com intervalo de confiança de 95%. Esses 5% restantes correspondem a uma resposta que pode ser produzida por amostra biológica positiva não quantificável ou falso negativo.

Esse limite corresponde ao seguinte cálculo:

$$\text{LOB} = \mu_B + 1,645 \times \sigma_B;$$

Onde μ_B e σ_B são a média e o desvio padrão das medidas em branco ou negativas, respectivamente ¹²⁸.

Com a finalidade de garantir a qualidade e fiel padronização do teste, foi realizado o teste de reprodutibilidade (ou interteste), no qual as amostras

quantificadas, inclusive o controle negativo, são testadas por outro operador, em outro local físico, e outros reagentes (exceto *primers*). Nesse teste espera-se que os resultados sejam os mais próximos possíveis da padronização.

4.8 SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS POSITIVAS

A purificação dos produtos de PCR das amostras positivas amplificadas foi feita com a utilização dos kits comerciais QIAQuick PCR *Amplification* Kit (Qiagen®) e Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel *Band Purification Kit* (GE Healthcare®) conforme instruções do fabricante, por conveniência de uso (kit já disponível no laboratório).

Após a purificação, uma eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo 1 µg/mL de brometo de etídio em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X) foi realizada para estimar indiretamente a massa (concentração) de DNA no produto amplificado. Para isso foi utilizado 4 µL do *Low DNA Mass Ladder* (Gibco®) como marcador, que se divide em bandas contendo 200, 120, 80, 40, 20 e 10 ng de DNA. Essas bandas, por terem diferentes tamanhos e intensidades são comparadas a banda do produto purificado da PCR, estimando assim, um valor aproximado de quantificação.

4.8.1 Reação de Sequenciamento Utilizando a Metodologia Sanger

A metodologia Sanger é um método de sequenciamento de DNA comercializado pela primeira vez pela *Applied Biosystems*® atualmente baseado na incorporação dideoxynucleotídeos terminadores de cadeia marcados, através da DNA polimerase durante a síntese da fita complementar de DNA *in vitro* ¹²⁹. Estes dideoxynucleotídeos (ddNTP) que terminam as fitas sintetizadas não possuem um grupo 3'-OH necessário para formar a ligação fosfodiéster entre dois nucleotídeos, fazendo com que a enzima DNA polimerase pare de estender a fita de DNA quando uma ddNTP é incorporada. Anteriormente com uma substância radioativa e hoje com substâncias fluorescentes diferentes para cada um deles (ddA, ddC, ddT, ddG) ¹³⁰, a marcação permite a leitura das cadeias sintetizadas, “terminadas” em diferentes tamanhos, por intermédio de eletroforese pelo sensor do aparelho de sequenciamento automatizado ABI PRISM® 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems®).

Aproximadamente 30 ng de produto amplificado foram adicionados a um microtubo do tipo *ependorf* contendo o *mix* para sequenciamento com os seguintes reagentes e suas quantidades: 1µM de *primer forward* ou *reverse*, 4,4 µL de *Mix Save Money* (Applied Biosystems Incorporation®), 1,3 µL de *Big Dye Terminator 5x sequencing buffer* (Applied Biosystems Incorporation®) e água, totalizando um volume final de reação de 20 µL. As condições de ciclagem utilizadas para estender as novas fitas dos fragmentos purificados foram: 25 ciclos de 96°C por 10 segundos para denaturação do DNA molde, 50°C por 5 segundos para anelamento dos oligonucleotídeos e 60°C por 4 minutos para a extensão da nova fita.

O produto obtido foi transferido para placas de 96 *wells* visando a remoção de dideoxynucleotídeos terminadores remanescentes e não incorporados. Para isso, uma purificação foi realizada adicionando-se em cada *well* 80 µL de Isopropanol

75%. A placa foi então incubada por 15 minutos no escuro em temperatura ambiente e centrifugada a 2000 x g por 45 minutos; o Isopropanol foi desprezado por inversão da placa seguido de centrifugação da placa invertida a 150 x g por 1 minuto.

Uma segunda lavagem foi realizada adicionando 80 µL de Etanol a 80%, seguido de centrifugação a 1000 x g por 15 minutos. Novamente, o Etanol foi desprezado por inversão da placa seguido de centrifugação da placa invertida a 150 x g por 1 minuto. Por fim, o *pellet* seco foi ressuspenso em 20 µL de formamida Hi-Di e as amostras foram sequenciadas ¹³¹

4.8.2 Sequenciamento das Amostras Utilizando NGS – *Next Generation Sequencing* - Plataforma Ion Torrent

Os produtos gerados nas PCRs convencionais que utilizam os *primers* denominados “Long PCR” e a amostra inicial descrita e publicada no artigo 8 da lista de artigos, foram sequenciadas utilizando a plataforma NGS.

O protocolo completo do sequenciamento em larga escala utilizando a plataforma *Personal Genome Machine* (PGM) Ion Torrent consiste de três etapas: construção da biblioteca; seguido pelo preparo de template; e finalmente o sequenciamento em chip semicondutor (Figura 8).

Figura 8 – Ion 314™ Chip V2 utilizado no sequenciamento pelo sistema PGM *Ion Torrent*. No próprio chip é feita a detecção da incorporação da base nitrogenada pela ação da polimerase através da liberação do H^+ e alteração de pH.

O início do protocolo consiste na construção de biblioteca que é realizada a partir da fragmentação do DNA alvo, seja via enzimática, utilizando um kit com enzimas de restrição (IonAmpliSeq™ DNA Library Kit), ou mecânica, utilizando o equipamento Bioruptor® UCD-200.

Após a quebra do DNA em fragmentos menores, estes recebem em suas extremidades dois adaptadores de DNA com sequências conhecidas (denominados A e P1). O adaptador A é necessário para ligação da amostra a ser sequenciada na *bead* magnética e o adaptador P1 corresponde a uma sequência pequena, alvo para o *primer* que será posteriormente utilizado na PCR de emulsão. Caso seja necessário processar mais de uma amostra no mesmo chip, são utilizados juntos a esses adaptadores sequências denominadas *barcodes*, que são sequências de DNA específicas, utilizadas de forma distinta para cada amostra, permitindo que no momento da análise cada amostra seja devidamente identificada.

Após esse passo, é realizada uma seleção por tamanho dos fragmentos através de eletroforese. O ideal é que a maioria dos fragmentos estejam entre 200 e 400pb. Essa eletroforese é realizada no gel denominado E-Gel® *SizeSelect*™ (Figura 9), disponível na concentração de agarose 2% e o tempo de corrida de no máximo 15 minutos aplicado sobre um sistema próprio denominado E-Gel iBase™ Power System (Thermo Fisher Scientific). O DNA é recolhido manualmente quando o tamanho desejado é atingido. No E-Gel existem 2 *wells* por coluna: no superior é colocada a amostra, e no inferior é feita a coleta do material do tamanho desejado.

Figura 9 – E-Gel® *SizeSelect*™ e E-Gel iBase™ Power System. As bandas nos poços de 1 a 8 são as amostras de DNA; no poço “M” encontra-se o marcador de pares de base. Na segunda fileira de *wells* é o local aonde é recolhido o DNA do tamanho desejado.

Recuperados os fragmentos, estes são encaminhados – sem a necessidade de purificação adicional - para o preparo de uma etapa denominada PCR em emulsão (emPCR). A emPCR consiste na amplificação clonal dos fragmentos de DNA que estão ligados em microesferas magnéticas (*beads*) através do adaptador P1, dentro de micelas geradas em um reagente oleoso (proveniente do kit Ion OneTouch™ 2System).

A amplificação dos fragmentos ocorre através do emparelhamento dos *primers* aos sítios complementares a estes presentes nos adaptadores. Terminado o tempo da emPCR, uma fase de enriquecimento separará as *beads* com fragmentos ligados daquelas sem amostra ligada utilizando o kit Ion PGM™ Sequencing200 Kit v2. Após isso é finalizada a etapa de preparo de *template*, com tempo de aproximado de 4 horas e 30 minutos.

Na etapa final, a amostra já devidamente preparada é depositada em um chip semicondutor. Para esse estudo foi utilizado o Ion314™ Chip Kit v2 (figura 8), que possui 1 milhão de *wells*. No fundo destes existe o que são tidos como os menores pHmetros existentes, nos quais as *beads* com DNA serão depositadas para sequenciamento. Cada *well* recebe uma *bead* e esse micro pHmetro é capaz de detectar variações elétricas oriundas da mudança de pH do meio.

Os reagentes contendo os nucleotídeos são separados, cada um contendo um desoxinucleotídeo trifosfato apenas (dA, dC, dT ou dG). De maneira cíclica, a liberação dos dNTPs é feita em uma determinada ordem, um de cada vez, nos poços onde estão as *beads*. Caso haja a incorporação de algum nucleotídeo nas fitas molde de DNA, a ligação fosfodiéster libera um íon de hidrogênio no meio para cada

base incorporada, alterando o pH. Essa variação é por fim detectada pelo pHmetro do poço e informada aos semicondutores do chip, que de acordo com qual dNTP foi liberado no passo imediatamente anterior, entende essa informação como incorporação da base. Isso repetido inúmeras vezes resulta na geração de leituras/sequências completas ao final do processo.

O tempo total de sequenciamento no equipamento é de aproximadamente 4 horas. Ao final do processo, mais de um bilhão de pares de bases (>1Gb) é obtido, fazendo dessa plataforma uma técnica eficaz no que diz respeito ao consumo de tempo e dinheiro (valor do equipamento aproximado de 80 mil dólares) na geração de dados brutos em comparação a outros equipamentos e protocolos disponíveis.

4.9 ANALISE BIOINFORMÁTICA DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS

A partir da década de 80, com os avanços da biologia molecular no sequenciamento do DNA, diante de novos desafios, novas ferramentas foram criadas, entre elas, foi desenvolvido em 1990 o BLAST (abreviação de *Basic Local Alignment Search Tool*)¹³², um algoritmo online que realiza buscas de similaridade entre uma dada sequência de DNA ou de proteína com alguma (s) das sequências depositadas no banco de dados público do GenBank. Este por sua vez é um banco mundial de sequências do NIH (sigla de *National Institutes of Health* – Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos), parte da colaboração do Banco de Dados Internacional de sequências de nucleotídeos, que compreende o banco de dados de DNA do Japão (DDBJ), o Laboratório Europeu de Biologia Molecular (EMBL) e

GenBank pelo NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). A utilização desta ferramenta é muito comum após qualquer tipo de sequenciamento (Sanger ou NGS), pois permite a confirmação do produto sequenciado e montado em ferramentas próprias para montagem dos *reads* gerados em plataformas de sequenciamento.

Os dados provenientes dos equipamentos de sequenciamento como o PGM *Ion Torrent* são analisados utilizando programas de algoritmos de alta complexidade. Diante dos avanços na forma de sequenciar, onde na década de 80, utilizávamos a metodologia Sanger (e apesar de antiga, uma das mais utilizadas até os dias atuais devido ao baixo custo), os programas de análise foram evoluindo cada vez mais a fim de viabilizar a montagem dos produtos sequenciados com alta qualidade.

Alguns parâmetros são utilizados para averiguar a qualidade da montagem do genoma. A cobertura reflete a quantidade de *reads* obtidos para uma determinada posição do DNA. Por exemplo, uma cobertura de 50X indica que cada base nitrogenada foi lida em 50 *reads*. Outro parâmetro importante é o denominado N50. Trata-se de uma medida estatística utilizada para avaliar a qualidade da montagem dos fragmentos sequenciados, visto que ele mostra o quanto de um genoma é coberto por *contigs* grandes. Um valor de N50 igual a X significa que 50% dos *reads* estão montados em um *contig* de tamanho X ou maior. Por exemplo, se temos 1000 pb para fazer a montagem e seu N50 = 300, isso quer dizer que 50% dos *reads* utilizados na montagem estão dentro de *contigs* com tamanho ≥ 300 pb. Além disso, outros parâmetros também são avaliados, como o tamanho dos *reads* obtidos no sequenciamento, a qualidade dos fragmentos via valor de *phred* (indicativo que calcula a probabilidade de erro da base sequenciada) ¹³³, entre outros.

Ao final de cada corrida as sequências geradas a partir do sequenciamento utilizando as plataformas Sanger e Ion Torrent foram exportadas do equipamento em formato FastQ para o *software* de análises *CLC Genomics Workbench 6* (CLCbio, QIAGEN) para análise, iniciando com a remoção de sequências de adaptadores.

No caso das amostras sequenciadas via *DirectSeq*, o protocolo a ser seguido consistiu em: a) Selecionar o arquivo FastQ; b) *trimar* a sequência alvo, afim de retirar as extremidades (que geralmente contem a maior parte dos erros de leitura) e c) realizar a análise com a ferramenta “DeNovo”, onde o próprio programa alinha as sequencias afim de tentar montar um alinhamento único (um novo *contig*). Após a obtenção dessa fita única, comparamos a sequência com alguma já existente utilizando o programa *online* BLAST.

Já no sequenciamento do tipo *Amplicon* (com previa amplificação) foram adicionados *barcodes* diferentes em cada amostra com o propósito de sequenciar varias amostras na mesma corrida. Após o sequenciamento, o protocolo de análise é praticamente o mesmo, porém, ao invés de utilizar a ferramenta “DeNovo”, utilizamos uma ferramenta que compara as sequências *trimadas* contra uma referência previamente conhecida.

Caso as sequências obtidas do arquivo *.fastq se alinhem com a sequência referencia, o programa cria um novo *contig*, e assim registramos a sequência como uma nova amostra positiva confirmada para TSPyV.

4.10 ISOLAMENTO DO POLIOMAVIRUS TSPyV EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES.

Para realizar o isolamento viral foram feitos 2 testes em paralelo, um no laboratório de Virologia do IMT - USP e outro no laboratório de Oncovirologia no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – ICB – USP.

Para os testes realizados no laboratório de Virologia foram escolhidas as seguintes linhagens celulares:

Vero - isolado a partir de células epiteliais de rim extraído de um macaco verde Africano (*Chlorocebus sp.*; antigamente chamadas *Cercopithecus aethiops*). Além disso são interferon-deficiente (ao contrário das células de mamífero normais, as células não secretam o interferon alfa ou beta quando infectadas por vírus) ¹³⁴;

HF4-Fibroblasto, originário de célula de fibroblasto em pulmão, é a célula mais comum a ser utilizada no isolamento viral ¹³⁵;

HEK-293, linhagem celular derivada de rim embrionário humano – Por ser de fácil manutenção, essa célula é amplamente utilizada para cultivo celular relacionado a expressão gênica;

LLC - MK2, célula proveniente de tecido renal de macacos rhesus (*Macaca Mulatto*), utilizada amplamente em isolamento viral ^{136, 137}.

Todas as células escolhidas para esse estudo foram cultivadas e infectadas utilizando o mesmo protocolo em garrafas com superfície de crescimento de 25 cm³ (60 mL), utilizando 10 mL meio de cultura Eagle (MEM-Alfa), um dos meios de

cultura sintético mais utilizados pois possui uma maior concentração de aminoácidos em relação a outros meios, suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB).

A manutenção das células foi feita de acordo com o tempo de crescimento das mesmas, onde algumas eram repicadas a cada 3 dias e outras uma vez por semana. Das garrafas que apresentam a monocamada celular com pelo menos 80% de confluência, o meio era retirado e as células eram lavadas 2 vezes com 5 mL de tampão fosfato-salino ou PBS, do inglês *phosphate buffered saline*, para a remoção de células mortas.

Após lavagem, foi adicionado 1 mL de Tripsina-EDTA, uma solução balanceada com Tripsina sem íons, Magnésio e Cálcio com um agente quelante, que atua "descolando" as células das garrafas de cultivo e desagregando os grupos celulares através de sua propriedade proteolítica, que atua sobre as proteínas da membrana celular. As garrafas foram incubadas em estufa a 37°C por alguns minutos (variando de acordo com cada tipo celular) para a ação da enzima.

Após o tempo de descolamento, foi adicionado 1 mL de meio de cultura, homogeneizando a solução dentro da garrafa até a desagregação de todos os grumos celulares. Aproximadamente 500 µL desse meio foi descartado, e completamos com mais 9,5 mL de meio para o crescimento e multiplicação das células.

Com a monocamada apresentando cerca de 75% de confluência, foram adicionados 100 µL de urina sabidamente positiva para TSPyV contendo 1E+05 cópias/mL. Após a inoculação, as células ficaram 1 hora a 37°C para adsorção dos vírus e após esse período, completamos com 5mL de meio Eagle suplementado com

2% de soro fetal bovino.

Após a inoculação, as células foram incubadas por 1 hora a 37 graus para adsorção dos vírus e após esse período, completamos com 5 mL de meio Eagle suplementado com 2% de soro fetal bovino.

Para os testes realizados no laboratório de Oncovirologia do ICB – USP foram escolhidas as seguintes linhagens celulares:

Vero, já descrita anteriormente;

Células neurais KNS – 42, célula de glioma humano (tumor de células gliais);

ONS – 76, proveniente de um meduloblastoma (câncer de cerebelo);

M-059, célula de origem de um tumor glioblastoma, tipo mais comum de câncer de cérebro.

Todas as células escolhidas para esse estudo foram cultivadas e infectadas utilizando o mesmo protocolo. As células foram cultivadas em garrafas de vidro com superfície de crescimento de 75 cm³ (250 mL), utilizando 10 mL meio de cultura Eagle MME (Meio Mínimo Essencial), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (Penicilina G cristalina 100 U/mL e Estreptomicina 0,1 mg/mL).

A manutenção das células foi feita com intervalos de 5 a 7 dias. Das garrafas que apresentavam tapete celular de pelo menos 80% de confluência, o meio era retirado e as células eram lavadas 2 a 3 vezes com 10 mL de tripsina (1:250, Difco) a 0,25% em associação com EDTA 0,02% pH 8,0.

Após o tempo de descolamento, foram adicionados 3 mL de meio de crescimento, igual ao meio de manutenção, porém acrescido de 10% de SFB. A seguir, as células foram ressuspensas com 60 mL de meio Eagle com 10% de SFB. Finalmente, essa suspensão foi distribuída em novas garrafas e tubos de cultura e mantidas em posição estacionária em estufa a 37°C.

A metodologia utilizada para o isolamento viral foi preconizada por Ângelo ¹³⁸ com modificações.

Alíquotas de 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL e 0,5 mL contendo 1+E05 cópias/mL do vírus foram inoculadas em tubos com as linhagens celulares previamente cultivadas conforme descrito anteriormente. As células ficaram durante 1 hora a 37 graus para adsorção dos vírus e após esse período, completamos com meio de cultura Eagle MME já utilizado anteriormente e analisadas a cada 5 a 7 dias para a detecção de possíveis efeitos citopáticos.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste T foi realizado para verificar a mediana da idade dos indivíduos.

A probabilidade de amostras positivas em urina e a associação entre os indivíduos positivos e as variáveis sexo, etnia e idade foram analisada pelo método X² (qui-quadrado) de Pearson, seguido do teste de Fisher.

Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Todas as variáveis foram avaliadas através do IBM SPSS® *Statistics* Base 19.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA TSPyV

5.1.1 PCR convencional utilizada para teste diagnóstico de detecção do TSPyV

A padronização da PCR convencional específica para região AgT utilizando os *primers* A e B teve início com a determinação da temperatura de anelamento e concentração final dos *primers*. A temperatura de anelamento com maior amplificação visual foi de 51°C, utilizado o *primer* A (Figura 10).

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com SYBR Safe™ 0,1 µL/mL para teste de temperatura de anelamento e de concentração final de *primers*. Os testes foram feitos aos pares, onde no primeiro poço foi colocado o produto obtido com o *primer* B, e no segundo com o *primer* A. Nas 2 primeiras posições temperatura de anelamento (T1) de 60°C; nas duas seguintes (T2), temperatura de anelamento de *primers* a 55°C; nas duas ultimas (T3), temperatura de 51°C. Controle negativo - N; Peso molecular - PM.

Foram testadas diferentes temperaturas de anelamento e os resultados com o *primer* A foram mais satisfatórios em relação ao B em todas as temperaturas testadas (Figura 11).

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com SYBR Safe™ 0,1 µL/mL para teste de concentração final dos *primers*. As duas primeiras posições são materiais amplificados utilizando o *primer* B (PB), e as colunas seguintes são

materiais amplificados com o *primer* A (PA) com temperatura de anelamento de 51°C; A posição nomeada como N representa controle negativo (água) e PM significa Peso Molecular.

A concentração de *primers* que se mostrou mais eficaz durante o teste foi a de 0,2 μM , onde todas as amostras sabidamente positivas testadas (uma amostra positiva e mais 3 diluições da mesma) foram amplificadas. Nas concentrações de 0,1 μM e 0,05 μM , visualmente, houve uma amplificação menor (Figura 12).

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com SYBR Safe™ 0,1 $\mu\text{L/mL}$ para teste de concentração final de *primers*. As duas primeiras posições (D1) contendo a concentração final de *primers* de 0,05 μM ; as duas seguintes (D2), contendo a concentração final de *primers* de 0,1 μM e nas duas últimas (D3), a concentração foi de 0,2 μM . A posição nomeada como Neg representa controle negativo (água) e PM significa Peso Molecular.

Além dos testes com *primers*, foram testadas diferentes concentrações de desoxirribonucleotídeo fosfatado (dNTP). Para tal, foram utilizadas amostras sabidamente positivas para o poliomavírus TSPyV (e suas diluições previamente testadas) em duplicatas, variando as concentrações de dNTPs.

Após a definição da concentração de *primers* e determinação da temperatura, os testes com diferentes concentrações de dNTP foi preparada com 27,1 µL de água DEPC, 0,2 µM de cada *primer* com a melhor concentração descrita, 5 µL de tampão 1X (50 mM de KCl, 10 mM de tris), 1,5 µL de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 1U de *Platinum® Taq* DNA Polimerase e 4 µL de dNTP nas concentrações a serem avaliadas. Alíquotas dos produtos de PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% + 0,1 µL/mL de SYBR Safe (Invitrogen®) (Figura 13).

Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com SYBR SafeTM 0,1 µL/mL das reações de PCR qualitativo usando diferentes concentrações de dNTP. Nas reações visualizadas nas canaletas de números pares foram testados DNA de

amostras brutas de urina e nas ímpares de sangue total. As amostras 1 e 2 foram testadas com 10 μM , as amostras 3-6 com 5 μM e as amostras 7 e 8 foram testadas com 2,5 μM . As colunas nomeadas com CN são controles negativos de reação.

Após a visualização dos resultados, optamos por utilizar a concentração de 2,5 μM de dNTP.

5.1.2 PCR convencional utilizado para amplificação do TSPyV com a finalidade de sequenciamento utilizando a metodologia Sanger – “*ShortPCR*”

Os *primers* utilizados para amplificação do genoma completo do vírus para sequenciamento na metodologia Sanger foram desenhados para amplificarem fragmentos entre 500 e 900 pares de base e com temperaturas de anelamento similares entre si. Diante disso, foram todos testados utilizando a temperatura de 51°C, dNTP a 2,5 μM e a concentração dos *primers* a 0,2 μM , conforme figura 14, e tamanhos identificados conforme tabela 5.

Tabela 5: Tamanho do fragmento gerados com *primers* (pb – pares de bases) utilizados para sequenciamento utilizando a metodologia Sanger.

<i>Primer</i>	Tamanho do Fragmento
P1	670 pb
P2	625 pb
P3	544 pb
P4	855 pb
P5	641 pb
P6	620 pb
P7	534 pb
P8	605 pb
P9	805 pb
P10	575 pb

Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com SYBR Safe™ 0,1 µL/mL das amostras amplificadas por PCR convencional utilizando os *primers* nomeados como “*ShortPCR*”. O número 1 no gel corresponde ao produto amplificado

utilizando o par de *primers* 1 (P1), o número 2 representa o par de *primers* 2 (P2) e assim sucessivamente até o número 10 (P10); canaleta com a sigla “Neg” identificando o controle negativo de cada reação e PM identificando o peso molecular. Para esse teste foi utilizada amostra de urina de uma paciente TS positiva.

5.1.3 PCR convencional utilizado para amplificação do TSPyV com a finalidade de sequenciamento utilizando a metodologia NGS – “*LongPCR*”

Para padronização da metodologia de PCR convencional utilizando os *primers* nomeados “LongPCR” (P1 e P2), com amostras de sangue, urina e biópsia positiva para TSPyV, foram utilizadas as mesmas concentrações e temperatura das demais reações, visto que a proporção GC dos *primers* utilizados são próximas. Porém, como os fragmentos gerados são grandes, o tempo de extensão da reação foi alterado para 4 minutos, conforme figura 15.

Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose das reações de PCR qualitativo contendo material amplificado de TSPyV utilizando *primers* denominados “*LongPCR*”, com melhor resultado de temperatura de anelamento dos *primers*. A coluna nomeada como PM significa peso molecular; as 2 colunas iniciais P1 e P2 foram produtos amplificados de amostra de sangue; as 2 colunas seguintes P1 e P2 foram produtos amplificados de amostra de biópsia; as 2 colunas finais P1 e P2 foram produtos amplificados de amostra de urina.

5.2 PADRONIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO POLIOMAVÍRUS TSPyV EM AMOSTRAS DE URINA ATRAVÉS DA qPCR COM A METODOLOGIA DE SYBR GREEN®

5.2.1 Determinação da Concentração de *Primers*

Foram consideradas como “ideais” as concentrações de *primers* de 0,2 μ M na reação final com 12 μ L de mix contendo reagente intercalante SYBR® *Green* (Life Technologies®), 0,2 μ M de cada *primer*, e 5,6 μ L de água DEPC. 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, 50 segundos a 51°C e 30 segundos a 60°C), e ao final da ciclagem foi adicionada a curva de dissociação. A reação foi padronizada utilizando o equipamento ABI 7300 (Applied Systems, USA).

Nessas condições, as amostras positivas testadas foram amplificadas (Figura 16). No teste ainda pudemos observar que na concentração de 0,1 μM , 50% das amostras foram positivas, e nos testes de 0,05 μM nenhuma amostra demonstrou amplificação.

Figura 16 - Amplificação de curvas-padrão por técnica de reação em cadeia por polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando SyBR. Cada curva representa diluições seriadas do plasmídeo (controle positivo) contendo segmento específico do TSPyV variando de $1,13\text{E}+06$ até $1\text{E}+03$ cópias por microlitro.

5.2.2 Adição de enzima *Platinum Taq* Polimerase na Reação de SYBR Green

Objetivando aumentar ainda mais a eficiência do teste utilizando SyBR *Green*, resolvemos adicionar mais enzima Taq DNA polimerase na mistura final. Segundo o manual do kit de *MasterMix* do SYBR® *Green* (*Life Technologies*®) um dos componentes presentes é a AmpliTaq Gold® DNA *Polymerase*, que necessita de uma ativação prévia de 5-10 min a 95°C. (Disponível em http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_042179.pdf).

Pensando nisso, foi adicionado 1 unidade por amostra a mais de enzima, porém da versão *Platinum*® Taq DNA polimerase (*Life Technologies*®), que também necessita de ativação prévia.

Essa alteração no protocolo fez com que a detecção fosse adiantada em aproximadamente 1 log (Figura 17). Interessantemente, a melhora ocorreu mesmo com a temperatura de extensão abaixo da sugerida para a *Taq Platinum* (72°C, sendo que na reação foi utilizado 60°C). Assim resolvemos incorporar ao protocolo 1 unidade de *Platinum*® Taq DNA polimerase por amostra.

Figura 17 - Amplificação de curvas-padrão por técnica de reação em cadeia por polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando a metodologia SyBR já com a adição da enzima Taq Polimerase. Cada curva representa diluições seriadas do plasmídeo (controle positivo), variando de $1,13 \times 10^6$ até 1×10^3 cópias por microlitro.

5.2.3 Quantificação e Identificação do *cut-off* Utilizando Diluições em Decaplicata do Plasmídeo na qPCR – Teste de *PROBIT*.

Diluições seriadas do plasmídeo, com concentrações que variaram entre $1,13 \times 10^5$ a 5×10^2 cópias/mL foram utilizadas para gerar curvas-padrão e quantificar o genoma do vírus TSPyV em número de cópias (Figura 18).

Figura 18 - Amplificação de curvas-padrão por técnica de reação em cadeia por polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando SyBR já com a adição da enzima Taq Polimerase. Cada curva representa diluições seriadas do plasmídeo (controle positivo) contendo segmento específico do TSPyV variando de $1,13E+06$ até $5E+02$ cópias por microlitro, determinando o limite inferior de detecção.

A quantificação do número de cópias do poliomavírus 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 na regressão linear obtidas a partir das curvas-padrão de cada vírus (Figura 19). Obteve-se uma regressão com índice de correlação (R^2) de 0,997, e *Slope* de 0.997, próxima ao ideal.

Figura 19 - Regressão linear das curvas-padrão do vírus TSPyV. Concentrações das diluições do plasmídeo (da esquerda para a direita): $5E+02$ cópias/mL, $1E+03$ cópias/mL, $1E+04$ cópias/mL, $1E+05$ cópias/mL e $1E+06$ cópias/mL.

O *cut-off* do teste (sensibilidade analítica) utilizando a metodologia SYBR Green foi de $5E+02$ cópias/mL (500 cópias/mL). Foram consideradas negativas ou indetectáveis as amostras que não apresentaram amplificação e positivas não-quantificáveis as amostras que apresentaram amplificação com valor inferior a $5E+02$ cópias/mL. Estas foram ainda repetidas a fim de confirmar esse resultado.

5.2.4 Cálculo da Sensibilidade, Reprodutibilidade e Especificidade das Reações de qPCR Utilizando Metodologia SYBR Green

Conforme demonstrado nas figuras 18 e 19, a sensibilidade analítica ou *cut-off* da técnica de qPCR para o vírus TSPyV foi de aproximadamente $5E+02$ cópias/mL. De modo a garantir a reprodutibilidade dos resultados, amostras positivas fora da curva determinada anteriormente, com cargas virais inferiores a $5E+02$ cópias/mL, foram consideradas não-quantificáveis ou denominadas positivas não-quantificáveis, ou seja, estão abaixo da capacidade de detecção e quantificação do teste – *cut-off*. Por outro lado, concentrações superiores a este valor, após terem sido repetidamente testadas, foram consideradas quantificáveis (Tabela 6).

A reação de qPCR para o vírus TSPyV mostrou alta reprodutibilidade já que os valores de desvio-padrão obtidos a partir de “deaplicatas” do plasmídeo foram próximas a $5E+02$ cópias/mL em 6 de 10 amostras testadas.

Tabela 6: Determinação do *cut-off* da reação de PCR em tempo real para TSPyV

através de diluições seriadas do plasmídeo, testadas em “decaplicatas” utilizando SyBR. Cópias por reação medidas em cp/mL.

		Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	
	curva	curva	curva	curva	curva	curva	curva	curva	curva	curva	
Nº cp/mL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média
1E+04	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	10
1E+03	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	10
5E+02	neg	pos	neg	neg	pos	pos	neg	pos	pos	pos	6
1E+02	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg	2
negativo	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0

Para determinar a especificidade das reações de qPCR, vinte amostras de sangue e vinte amostras de urina sabidamente positivas para os vírus MCPyV (4 amostras de cada material), JCPyV e BKPyV (8 amostras de cada material, respectivamente) foram testadas, utilizando a metodologia da reação de qPCR para TSPyV e nenhuma das amostras foi positiva.

Para garantir a qualidade e fiel padronização do teste, foi realizado o teste de reprodutibilidade ou interteste, teste o qual as amostras sabidamente quantificadas são testadas por outro operador, em outro local físico, e outros reagentes (exceto *primers*) e os resultados precisam ser exatamente os mesmos. Foram realizados testes de reprodutibilidade com três pontos da curva (1,13E+07; 1,13E+05 e

1,13E+03 cópias/mL) por outro operador em datas distantes da padronização e os resultados se mantiveram os mesmos.

5.3 PADRONIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO POLIOMAVÍRUS TSPyV EM AMOSTRAS DE URINA ATRAVÉS DA qPCR COM SONDAS DE HIDRÓLISE TAQMAN

5.3.1 Determinação da Concentração de *Primers*

Assim como os demais testes, a concentração de *primers* que se mostrou mais eficaz para utilização no teste foi a de 0,2 µM. A reação final foi preparada com 12,5 µL de MasterMix, 1,0 µL de cada *primer*, 1,0 µL de sonda e 5,1 µL de água DEPC. Os parâmetros da reação foram os *default* dos próprios equipamentos utilizados para padronização, porém a temperatura de anelamento e extensão foi de 58°C.

No teste, houve amplificação em 100% das amostras. Ainda pudemos observar que na concentração de 0,1 µM, 75% das amostras foram positivas, e nos testes de 0,05 µM 25% das amostras produziram amplificação.

5.3.2 Quantificação e Identificação do *cut-off* Utilizando Diluições em Decaplicata do Plasmídeo Através da qPCR – Teste de *PROBIT*.

Diluições seriadas do plasmídeo, com concentrações que variaram entre $1,13 \times 10^{10}$ a $1,13 \times 10^2$ cópias/mL, foram utilizadas para gerar curvas-padrão e quantificar o TSPyV (Figura 20).

Figura 20 - 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 TSPyV feitas em "decapicatas" variando de $1,13 \times 10^{10}$ até $1,13 \times 10^2$ cópias/mL.

A quantificação do número de cópias do Poliomavírus em amostras de urina foi realizada através do cálculo da média dos valores do ciclo *threshold* (*Ct*) obtidos para cada amostra e a respectiva “plotagem” destes na regressão linear obtidas a partir da curva padrão (Figura 21). Obteve-se uma regressão linear com um índice de correlação de 0,999.

Figura 21 - Regressão linear das curvas-padrão do vírus TSPyV. Concentrações das diluições do plasmídeo (da esquerda para a direita), variando de $1,13 \times 10^{10}$ até $1,13 \times 10^2$ cópias/mL.

1,13E+02	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	pos	pos	neg	7
5,65E+01	neg	pos	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	3
negativo	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0

A reação de qPCR para o TSPyV mostrou elevada reprodutibilidade, visto que os valores dos desvios-padrão obtidos na “decaplicata” das diluições do plasmídeo foram superiores a 100 cópias em 7 amostras.

Foram realizados testes de reprodutibilidade com três pontos da curva (1,13E+07; 1,13E+05 e 1,13E+03 cópias/mL) por outro operador, com outro equipamento em datas distintas e os resultados se mantiveram os mais próximos possíveis.

Para determinar a especificidade das reações de qPCR, vinte amostras de sangue e vinte amostras de urina sabidamente positivas para os vírus MCPyV (4 amostras de cada material), JCPyV e BKPyV (8 amostras de cada material, respectivamente) foram testadas, utilizando a metodologia da reação de qPCR para TSPyV e nenhuma das amostras foi positiva.

5.4 DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA E CARGA VIRAL DO POLIOMAVÍRUS TS EM AMOSTRAS DE SANGUE E URINA DE INDIVÍDUOS IMUNOCOMPROMETIDOS E IMUNOCOMPETENTES.

Amostras de sangue e urina de 71 pacientes submetidos a transplante de rim e 71 indivíduos saudáveis foram testadas utilizando a metodologia *TaqMan*®, totalizando 426 amostras de urina (3 por indivíduo de cada grupo) e 142 amostras de sangue (1 por indivíduo de cada grupo).

A mediana de idade entre os participantes foi de 38 anos (*range* - 19-66 anos). Analisando as faixas etárias dos participantes imunocomprometidos, dos 71 indivíduos participantes do estudo, 20 (28,2%) tinham entre 18 e 35 anos, 21 (29,6%) tinham entre 36 e 50 anos e 30 (42,2%) são maiores de 51 anos. Já entre os indivíduos saudáveis, 49 (69%) tinham entre 18 e 35 anos, 12 (16,9%) tinham entre 36 e 50 anos e 10 (14,1%) tinham mais de 51 anos.

Dos 142 indivíduos imunocomprometidos e saudáveis avaliados, 35 (49,3%) e 54 (76%) eram do sexo feminino, respectivamente.

Nenhum indivíduo saudável estava tomando qualquer medicamento que pudesse influenciar a excreção viral urinária, e nenhuma das mulheres estava grávida durante o período de estudo.

Levando em consideração a presença de TSPyV em pelo menos uma amostra (sangue inicial ou urina), a incidência de TSPyV em indivíduos imunocomprometidos foi de 41 (57,7%) e apenas 1(1,4%) indivíduo saudável.

Não houve diferença em relação a presença do vírus entre gêneros [homens (43,9%) e mulheres (56,1%)], idade e etnia entre os indivíduos imunocomprometidos positivos para TSPyV. Oito indivíduos imunocomprometidos (19,5%) apresentaram excreção de TSPyV em 2 coletas (Tabela 8).

A carga viral dos indivíduos positivos variou entre $8.5E+1$ até $2E+2$ cópias / mL exceto no paciente TSV_13 (paciente inicial do estudo), único que desenvolveu a doença TS, que variou entre $1.13E+8$ até $5.8E+11$ cópias / mL.

Tabela 8: Indivíduos imunocomprometidos positivos para virúria de TSPyV, classificados por idade, gênero e etnia, conforme coletas de sangue e urinas; Em gênero: M – Masculino, F – Feminino; Em etnia: C – Caucasiano, M – Mulato, N – Negro. Em destaque, 8 indivíduos que apresentaram mais de uma coleta positiva para TSPyV no estudo.

Indivíduo	Idade	Sexo	Etnia	Sangue +	1 Col. Urina +	2 Col. Urina +	3 Col. Urina +	Total Col. Urina +
1	43	F	M		+			1
2	34	M	C		+			1
3	21	M	N		+	+		2
4	51	F	C				+	1
5	40	M	C	+				1
6	68	M	C	+	+			1
7	38	M	M				+	1
8	43	M	C				+	1
9	29	M	M	+	+		+	2
10	66	F	C			+	+	2
11	27	F	M			+		1
12	54	F	C	+			+	1
13	72	F	C		+	+		2
14	35	F	M				+	1
15	29	F	C	+				1
16	33	F	M	+			+	1
17	53	F	C	+				1
18	30	M	C		+			1
19	18	F	C			+		1
20	61	F	C		+			1
21	54	F	C			+		1
22	44	F	M		+			1

23	48	M	C		+		+	2
24	48	F	M	+			+	1
25	51	M	C				+	1
26	32	M	C		+			1
27	61	F	C			+		1
28	32	M	C	+				1
29	50	F	N		+			1
30	29	F	C	+				1
31	29	F	C				+	1
32	29	M	M	+	+			1
33	60	F	C	+	+		+	2
34	54	M	C			+		1
35	35	M	C		+	+		2
36	48	M	C			+		1
37	45	F	C				+	1
38	61	M	C		+			1
39	47	F	N	+		+	+	2
40	62	F	C	+		+		1
41	48	M	C				+	1

Em relação a presença do TSPyV no sangue: nenhum indivíduo saudável apresentou viremia (amostra de sangue total), e entre os indivíduos submetidos ao transplante de rim, 12,2% (5 indivíduos) foram positivos para TSPyV. Não houve diferença relevante entre os indivíduos considerando grupos de idade, sexo e etnia (tabela 9).

Tabela 9. Indivíduos submetidos a transplante renal virêmicos para TSPyV.

Indivíduo	Sexo	Etnia	Idade
A	M	Caucasiano	40
B	F	Caucasiano	29
C	F	Caucasiano	53
D	M	Caucasiano	32
E	F	Caucasiano	29

5.5 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE TSPyV EM AMOSTRAS DE ÁGUA

Dentre as 52 amostras de água coletadas entre Março de 2015 e Março 2016 em 4 diferentes pontos ao longo do arroio Belo, na região de Caxias do Sul – RS, testadas para TSPyV, nenhuma apresentou positividade tanto na qPCR quanto na PCR convencional.

5.6 DETERMINAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE TSPyV EM AMOSTRAS DE URINA, LEITE MATERNO E SALIVA E AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL TRANSMISSÃO VERTICAL DO VÍRUS.

Foram investigados noventa e cinco pares de amostras de mãe, incluindo uma amostra/indivíduo de leite e urina em conjunto com a saliva dos respectivos bebês (total de 285 amostras) para a presença de TSPyV.

Dez de noventa e cinco amostras de leite materno testadas (10,5%) foram positivas para TSPyV; e entre as 95 urinas testadas, 2 (2,1%) foram positivas para TSPyV. Não foi detectado TSPyV na saliva de nenhum recém-nascido. Ainda, não houve correlação entre as amostras que foram positivas para leite e as que foram positivas para urina (mesmo indivíduo excretando vírus por 2 vias diferentes).

5.7 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Após a amplificação do genoma completo utilizando as metodologias padronizadas, os *amplicons* curtos (“*ShortPCR*”) foram sequenciados pelo método de Sanger utilizando o equipamento ABI Prism 3100 (Applied® Biosystems Incorporation, Foster City, CA), e os produtos obtidos a partir dos *primers* denominados “*LongPCR*” foram sequenciados na plataforma NGS Ion Torrent PGM™ (Thermo Fisher®), de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras sequenciadas possuíam carga viral acima de 1.0E+3 cópias e valores abaixo disso, apesar de serem quantificáveis, a reação de sequenciamento não foi satisfatória.

Em ambos os casos, a montagem do genoma foi realizada no *software* CLC v6 (CLC Bio, Qiagen). Para esta análise, utilizamos como referência a sequência do genoma viral presente em biópsia do mesmo paciente previamente obtida por sequenciamento do tipo *Direct Seq* (*Genbank id.* KM007161). Três amostras de sangue e urina coletadas em diferentes momentos da mesma paciente foram utilizadas para a padronização das metodologias de sequenciamento de *amplicon* por Sanger e NGS.

As amostras sequenciadas da paciente TSV_01 foram depositadas no banco de dados público de sequências *GenBank* com as identificações - KX249740 e KX249741 (amostras de sangue coletadas em Fevereiro e em Abril, respectivamente) utilizando a metodologia NGS; e KX249742 (amostra de sangue coletada em Abril) e KX249743 (Amostra de urina coletada em Abril) utilizando a metodologia Sanger.

Diante das sequências obtidas através dos sequenciamentos pelas plataformas Sanger e NGS (*Ion Torrent*), análises filogenéticas utilizando modelos de substituição adequados a cada conjunto de sequências foram analisados. Para isso, utilizamos o algoritmo do PhyML presente no pacote *SeaView*, com *bootstrap* de 1000. O modelo de substituição adequado para a árvore de genoma completo foi HKY+I e para as árvores com genoma parciais de AgT e VP1 o modelo F81+I, conforme figuras 22-25. Foram utilizadas para análise comparativa e montagem das árvores sequências referência disponíveis no *GenBank*. Foi sugerida recentemente classificação do TSPyV em três genótipos, de acordo com filogenia reconstruída a partir de genoma completo. Na reconstrução onde incluímos duas sequências de genoma completo de vírus brasileiros, destacamos os genótipos já descritos e os sugeridos no presente trabalho.

Figura 22 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança do genoma completo do TSPyV, utilizando o modelo de substituição nucleotídica HKY+I. As amostras do estudo estão em vermelho e em preto as demais amostras de sequências de referência obtidas no *GenBank*. Os valores de *bootstrap* estão expressos em porcentagem por 1000 réplicas. Ao lado dos ramos, os genótipos I, II e III segundo classificação de Kazem et al (2016), e os sugeridos genótipos IV e V para as sequências brasileiras.

Figura 23 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança do fragmento do Antígeno T Grande (LTA_g) do nucleotídeo de posição 2735 até 3689 do TSPyV, utilizando o *primers* “ShortPCR” P7 e P8, utilizando o modelo de substituição nucleotídica F81+I. As amostras do estudo estão em vermelho e em preto as demais amostras são sequências de referência obtidas no *GenBank*. Os valores de *bootstrap* estão expressos em porcentagem por 1000 réplicas.

Figura 24 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança do fragmento do Antígeno T Grande (LTA_g) do nucleotídeo de posição 3665 (*primer reverse* P1) até 4357 (*primer reverse* P2) do TSPyV, utilizando o modelo de substituição nucleotídica F81+I. As amostras do estudo estão em vermelho e em preto as demais amostras são sequências de referência obtidas no *GenBank*. Os valores de *bootstrap* estão expressos em porcentagem por 1000 réplicas.

Figura 25 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança dos fragmentos do Antígeno T Grande (LTA_g) juntos na mesma análise, denominado como “Concatenado”, utilizando o modelo de substituição nucleotídica F81+I. As amostras do estudo estão em vermelho e em preto as demais amostras são sequências de referência obtidas no *GenBank*. Os valores de *bootstrap* estão expressos em porcentagem por 1000 réplicas.

Uma análise mais detalhada do alinhamento das sequências mostra que os agrupamentos das amostras sequenciadas nesse estudo se dá por conta de alguns

nucleotídeos diferentes ao longo da sequência, como por exemplo as posições 5302, 5359 e 5392 (Figura 26). Importante, a contagem de nucleotídeos discrepantes entre a sequência brasileira (TSV_denovo) e as demais revelou ao menos 30 diferenças. Uma contagem de nucleotídeos discrepantes entre a sequência completa do vírus do paciente 13 (TSV_13) revelou menos diferenças – cerca de 20-23 em relação as demais. Portanto, nucleotídeos discrepantes em número suficiente (de acordo com classificação de Kazem⁹⁰) são suficientes para classificar as sequências brasileiras em dois novos genótipos.

Figura 26 - Análise e comparação do fragmento da região de controle não codificante das sequências completas do TSPyV obtidas nas amostras desse estudo comparadas com algumas referências obtidas no *GenBank*, onde as sequências “TSVAMPLICONOK” e “TSV_denovo” foram obtidas através do sequenciamento do genoma completo do TSPyV pelas metodologias Sanger e NGS respectivamente.

5.8 ISOLAMENTO DO POLIOMAVIRUS TSPyV EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES.

5.8.1 Protocolo Utilizado no Laboratório de Virologia.

Após 5 dias da inoculação nas células escolhidas, foi observado um crescimento atípico das células HF4 e Vero. Essas garrafas com células inoculadas foram repicadas a cada 7 dias para manter o inócuo do vírus, e assim, observando cada vez mais as possíveis alterações causadas nas células.

Das 4 linhagens testadas, a célula HF4 foi a que mais apresentou alterações no tapete celular formado, e a que menos apresentou foi a MK2. Diante disso, após 15 dias de inoculação, uma garrafa foi tratada com tripsina para que as células da monocamada fossem descoladas e a mesma foi centrifugada. O *pellet* formado foi ressuspenso em uma solução própria para o procedimento de microscopia eletrônica, identificando assim o vírus isolado (Figuras 27 e 28).

Figura 27 – Poliomavirus Humano TSPyV presente em cultura de células HF4, destacado com a seta identificando o vírus na imagem

5.8.2 Protocolo Utilizando no Laboratório de Oncovirologia do ICB – USP.

As garrafas contendo as células selecionadas para esse estudo e inoculadas com TSPyV foram repicadas a cada 7 dias. Foi determinado pelos colaboradores desse estudo como célula susceptível ao vírus a que apresentasse efeito citopático até a 4 passagem. Após a segunda passagem, foi observado o início de um provável efeito citopático somente na linhagem VERO, porém, continuou-se o acompanhamento de todas as linhagens por mais 4 passagens com o objetivo de verificar um possível efeito futuro.

Estas alterações de efeito citopático são decorrentes da inibição da síntese de ácidos nucleicos e proteínas, da fusão entre as células, alterando assim a permeabilidade celular¹³⁹.

Após 4 passagens consecutivas, a única linhagem que aparentemente apresentou efeito foi a VERO (Figura 29), confirmando a presença do vírus por qPCR.

Figura 28 – Monocamada de células VERO antes da inoculação viral (esquerda) e após 4 passagem a partir da inoculação viral (direita), onde é possível notar sinais de um possível efeito citopático.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Este estudo teve como principal finalidade elucidar questões sobre o Poliomavirus TS que ainda estavam obscuras para a comunidade científica, como por exemplo a presença do vírus em amostras de sangue e a incidência e o perfil de excreção em indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos (artigo 4, na lista de artigos). Além disso, um novo PCR quantitativo com alta sensibilidade e especificidade foi desenvolvido e por fim, foi demonstrado que o diagnóstico para TS pode ser feito através de metagenômica por *DirectSec* diretamente de amostras de biópsias de pele (artigo 2, da lista de artigos).

Com o objetivo de esclarecer estes pontos e dado a falta de informações sobre esse vírus, a principal ferramenta do estudo foi a padronização de técnicas moleculares (PCR convencional e qPCR) para detecção do TSPyV em diferentes amostras biológicas e posterior sequenciamento dos vírus encontrados (Artigo 2, da lista de artigos).

Neste estudo, apresentamos pela primeira vez a viremia do TSPyV (presença de DNA viral em amostra de sangue total) em pacientes imunossuprimidos que não desenvolveram TS, (Artigo 4, na lista de artigos). Isso foi particularmente importante pois até então o DNA do TSPyV nunca havia sido amplificado a partir de amostras de sangue^{140, 141}, nem mesmo em pacientes com doença avançada^{36, 114, 122, 142}.

O teste descrito aqui pode representar um ganho na detecção de TSPyV no sangue, urina e material de biópsia e, virtualmente, em outras amostras biológicas, embora a validação em outros materiais ainda seja necessária.

A frequência de TSPyV em amostras de sangue total encontrada foi relativamente expressiva entre amostras clínicas de indivíduos imunocomprometidos

(aproximadamente 12%), contrastando com o resultado em indivíduos saudáveis, onde não foi encontrada nenhuma amostra positiva para o vírus nas amostras de sangue. Em comparação aos demais vírus da mesma família, esse valor é discrepante aos demais Poliomavirus, visto que encontramos na literatura taxas de viremia 10 a 30% em indivíduos sadios ¹⁴³⁻¹⁴⁵. Ainda, em indivíduos imunocomprometidos submetidos ao transplante renal e indivíduos soropositivos para HIV, dependendo da faixa etária varia de aproximadamente 30%, podendo chegar a 90% ¹⁴⁶⁻¹⁵⁰.

Embora possa representar um progresso no diagnóstico de TS, mais testes podem e devem ser desenvolvidos com o objetivo de otimizar o *cut-off*, assim como ocorre com outros poliomavirus onde o *cut-off* dos testes pode chegar a 3 cópias/mL ou menos ¹⁵¹.

A relação entre imunossupressão, reativação viral e desenvolvimento de TS não está clara até agora. Ainda que a doença TS ocorra apenas em pacientes gravemente imunocomprometidos, a presença de TSPyV entre indivíduos que desenvolveram TS e amostras de pacientes imunodeprimidos não-TS é sugestiva de infecção subclínica latente.

Alta frequência de excreção urinária de TSPyV foi encontrada entre os indivíduos imunossuprimidos avaliados no presente estudo, sendo similares a outros Poliomavírus como JCPyV (variando de 20 a 50%) ^{116, 152, 153}. Entre os indivíduos avaliados, 57,7% dos imunocomprometidos e 1,4% dos imunocompetentes foram positivos para TSPyV em pelo menos uma amostra de urina, concordando com as altas prevalências de excreção dos Poliomavírus JCPyV e BKPyV descritas no Brasil em indivíduos não-sadios, independente da faixa-etária, variando de 50-80% ^{147, 153-}

Esta taxa é muito maior que a observada em um estudo anterior do nosso grupo, com outra casuística que apresentou viremia de quase 30% de TSPyV (artigo 4 da lista de artigos).

Não houve diferença entre os pacientes deste estudo quando foi analisada taxa de excreção *versus* idade, diferentemente dos outros vírus desta família, que apresentam uma menor excreção em jovens adultos, aumentando em indivíduos idosos^{116-119, 152}.

Os Poliomavírus são frequentemente detectados em indivíduos saudáveis¹⁵⁶⁻¹⁵⁸ e a excreção urinária é frequente em crianças e adultos^{147, 157, 159-162}. Além da excreção na urina, os Poliomavírus também são excretados em fezes de crianças e adultos e o Poliovírus BK é o mais frequente em crianças pequenas^{163, 164}.

Embora existam muitas informações na literatura sobre as vias de excreção desses vírus, existem poucos estudos que exploram a transmissão. Por exemplo, sabemos que vírus como Papilomavírus humano, HIV, Citomegalovírus, HTLV, Zika, Dengue e Chikungunya já foram detectados no leite materno¹⁶⁵⁻¹⁶⁷, e a transmissão de alguns deles é possível por essa via. Entretanto, a pesquisa de poliovírus nesse material biológico é negligenciada. Diante disso, encontrar TSPyV no leite materno pode sugerir uma possível rota de infecção^{166, 168-170}. De fato, a presença de poliomavírus JCPyV, MCPyV, HPyV6 e 7 em tecidos de tumor de mama já foi relatada, abrindo a possibilidade de sua presença também no leite materno^{171, 172}. No entanto, a positividade desses vírus parece ser muito menor do que a observada para HPV e Herpesvírus no tecido mamário¹⁷².

No presente estudo, ao pesquisar pares mães/bebês, o TSPyV foi detectado em 10% das amostras de leite materno, mas não foi encontrado na saliva de recém-nascidos destas mães. A ausência do vírus na saliva não significa que o TSPyV não

possa ser transmitido por amamentação, uma vez que apenas uma amostra de saliva foi coletada de cada recém-nascido. Jeffers e colaboradores ¹⁷³ relataram BKPyV na saliva e demonstraram que as glândulas salivares humanas podem ser infectadas produtivamente com BKPyV, sugerindo que este pode constituir um reservatório importante para este vírus.

Outros grupos demonstraram com sucesso a presença de Poliomavírus na saliva de adultos saudáveis e receptores de transplante renal ^{150, 173, 174}. Os Poliomavírus também foram detectados na saliva de crianças, sendo 28,3% HIV-positivas de 6 a 13 anos e em 10% de crianças imunocompetentes de 7 a 12 anos ¹⁴⁹. Analisando em conjunto os resultados das diferentes coortes, demonstramos que TSPyV foi mais frequente no leite materno em relação a urina de imunocompetentes, sustentando que as rotas utilizadas para a transmissão podem ser diferentes entre os vírus da família *Polyomaviridae*.

Ainda sobre possíveis rotas de infecção, a presença de HPyVs em águas residuais e outros ambientes de água em todo o mundo é frequente, aumentando a possibilidade de transmissão hídrica ¹⁷⁵⁻¹⁷⁸.

Vários vírus são excretados em resíduos humanos e animais e são classificados como tendo um impacto na saúde de moderado a alto ¹⁷⁹. O contato direto com a eliminação de resíduos humanos nos ambientes naturais como os escoamentos agrícolas, urbanos e pecuários em/ou perto desses pontos de coleta, explicariam a contaminação do meio com os Poliomavirus.

Até o presente momento, não há estudos sobre TSPyV que monitoraram indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos coletando amostras ao longo do tempo. Diante dos resultados das 3 coletas de cada indivíduo, 19,5% (8/41) apresentaram excreção de TSPyV em 2 amostras e nenhum indivíduo apresentou as

3 amostras positivas, sugerindo que o perfil de excreção deste vírus não é contínuo. Observando trabalhos sobre a excreção de outros Poliomavírus, o padrão de excreção de amostras sequenciais testadas durante um longo período de seguimento é geralmente esporádico ou intermitente^{156, 180, 181}.

Diferentemente dos achados descritos nesse trabalho, vários grupos mostraram alta prevalência de HPyVs em amostras de água de esgoto e outros ambientes em todo o mundo, uma vez que esses vírus são muito resistentes ao longo do tempo e também ao tratamento de água com baixo pH^{178, 182, 183}.

Recentemente, descreveu-se a presença de JCPyV e BKPyV em amostras de água de um afluente na região no Sul do país¹⁸⁴, próxima ao local onde foram realizadas as coletas das amostras utilizadas nesse estudo. Portanto, além dos vírus dessa família circularem neste ambiente e, embora todos eles possam fazer parte do viroma humano, nenhuma amostra positiva para TSPyV foi encontrada. A título de informação, dizer que nosso grupo também buscou outros poliomavirus nesse mesmo material e encontrou JCPyV e BKPyV em mais da metade das amostras (Urbano e colaboradores, em revisão¹⁰⁹).

Outros estudos com amostras de rios localizados na área do Mediterrâneo em Barcelona (Espanha) e Rio de Janeiro (Brasil), que recebem esgoto doméstico de áreas urbanizadas, também foram objeto de análise por outros grupos, revelando 100% de positividade para JCPyV¹⁸⁵. A presença do vírus JCPyV na água da região metropolitana de Berlim também foi demonstrada pelo mesmo grupo e concorda que JCPyV é o poliomavírus mais prevalente em ambientes naturais, possivelmente devido à contaminação com resíduos humanos. Até a presente data nenhum estudo havia procurado o TSPyV em suas casuísticas.

Apesar de as rotas fecal-oral e hídricas para a infecção por poliomavírus serem bem aceitas, dois recentes estudos sugerem que, para o TSPyV ao menos, a via respiratória pode ser mais importante ^{45, 186}.

Além dos estudos sobre transmissão e prevalência, fez parte do objetivo deste estudo padronizar métodos de amplificação e sequenciamento do TSPyV. Diante das amplificações obtidas com os métodos padronizados, estudos epidemiológicos e filogenéticos serão possíveis utilizando conjuntos de *primers* e métodos automatizados de sequenciamento como NGS. O método de pré-amplificação por PCR convencional pode ser virtualmente usado em qualquer plataforma de sequenciamento, e, usando o sistema de codificação de barras nas plataformas de nova geração, várias amostras podem ser sequenciadas ao mesmo tempo.

Além disso, a metodologia que emprega a amplificação de fragmentos menores (“*ShortPCR*” nesse trabalho) representa uma boa opção para essas plataformas em que a geração de dados é menor (ou seja, Sanger; Ion Torrent; Roche 454 Jr), diferentemente da metodologia com fragmentos maiores (“*LongPCR*”) ou sequenciamento direto da amostra bruta que utiliza plataformas de alto rendimento como Illumina ou Ion Proton.

Observando as amostras sequenciadas através da reconstrução da árvore de genoma completo, podemos observar que uma das amostras do Brasil se localiza em um *cluster* diferente dos *clusters* formados pelas referencias, sugerindo assim um novo genótipo ou subgrupo além dos já descritos por Kazem e colaboradores ¹⁸⁷. No referido trabalho, apenas 13 amostras foram usadas para classificar TSPyV em genótipos (I, II e III) e os vírus isolados no Brasil ^{109, 115}, Holanda ³⁶ e Japão ¹⁸⁸ não foram incluídos nesta análise.

Ainda analisando o trabalho de Kazem ¹⁸⁷, ele descreve que os referidos genótipos se diferenciam entre si por 7-13 nucleotídeos, dependendo da sequência em questão. A sequência do vírus mais distante na análise de Kazem ¹⁸⁷ possui até 20 nucleotídeos distintos das demais sequências. Seguindo esse raciocínio, portanto, as sequências brasileiras caracterizam sim um novo genótipo, uma vez que se diferenciam das demais em aproximadamente 30 e 23 nucleotídeos (TSV_1 e TSV_13 respectivamente).

Comparando as reconstruções das sequências específicas de AgT, tanto as árvores com as sequências fragmentadas quanto a análise concatenada, podemos observar que as amostras se agruparam de forma diferente, exceto pela amostra TSV_13, que em quase todos os casos está em um *cluster* separado das demais amostras do Brasil, novamente apontando para a existência de um possível novo genótipo ou subgrupo circulante, além do já sugerido anteriormente formado pelas demais amostras do Brasil. Nota-se porém, que a localização da amostra do paciente 13 (TSV_13) fica claramente questionável na reconstrução feita usando o Antígeno T Grande (LTA_g) - posição 2735 a 3689 (Figura 23 do item Resultados). Nessa árvore, a sequência do TSV_13 está idêntica aos vírus analisados na Austrália. Entretanto, sabemos pelas demais reconstruções, inclusive a que utilizamos o genoma completo, que é irreal assumir que a sequência TSV_13 é idêntica ao vírus Australiano. Como mencionado nos resultados, o TSV_13 difere em cerca de 20-23 nucleotídeos das demais sequências de referência; entretanto, as regiões variáveis das demais amostras brasileiras são mais frequentes e distintas em relação ao TSV_13. Por isso, talvez as árvores das diferentes regiões pareçam ser mais consistentes para as amostras brasileiras que formam um grupo único, do que para o vírus do indivíduo 13.

Diante dos dados gerados pelas diferentes reconstruções das árvores filogenéticas, podemos concluir que o TSPyV não pode ser classificado utilizando somente um fragmento viral, diferente do que ocorre para JCPyV e o BKPyV que são genotipados utilizando somente a proteína de membrana VP1¹⁸⁹⁻¹⁹¹. O TSPyV possui regiões extremamente conservadas entre diferentes linhagens que, se usadas de maneira restrita para classificação, irá certamente resultar em erros.

De fato, um estudo publicado por Buck e colaboradores¹⁹² mostrou diferentes análises filogenéticas com sequências das proteínas VP1, VP2, VP3, AgT e Agt, demonstrando que para uma maior precisão taxonômica e determinação genotípica dos poliomavirus, a melhor forma seria analisando o genoma completo do mesmo.

Os resultados descritos nesta tese são inovadores, visto que existem poucos dados publicados sobre esse vírus.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Nesse trabalho foi observado que as reações de PCR e qPCR, padronizadas para detecção de DNA de TSPyV em diferentes materiais como sangue, urina e até amostras de água da natureza são específicas e bem sensíveis.

Os métodos moleculares aqui descritos permitem o sequenciamento do genoma completo de TSPyV em todas as plataformas existentes, podendo efetivamente contribuir para o acúmulo de informações sobre a diversidade genética deste Poliomavirus

Levando em consideração a presença de TSPyV em pelo menos uma amostra (sangue ou urina), a prevalência geral do vírus foi relativamente alta, 57,7%, sugerindo que o vírus é comumente encontrado em indivíduos imunocomprometidos, porém, apenas 1,4% dos indivíduos sadios do estudo excretaram o vírus.

O estudo aponta que não há diferença entre os indivíduos positivos quando comparado o sexo, etnia e idade dos mesmos.

Não foi encontrado vírus nas amostras de água, porém, além da detecção no sangue e urina, foi identificada a presença do vírus em amostras de leite materno, sugerindo assim uma possível rota de transmissão via aleitamento materno.

As análises filogenéticas realizadas a partir de diferentes regiões gênicas bem como o genoma completo, indicam que o genoma do TSPyV possui diferentes graus de conservação/diversidade, sendo mais confiável, portanto sua classificação através do genoma completo.

O sequenciamento de genoma completo de vírus detectados em dois indivíduos (TSV_01 e TSV_13) permite dizer que no Brasil existem dois novos

genótipos circulantes (TS IV e TS V), que não foram encontrados em outras regiões geográficas.

Apesar do vírus mostrar um potencial causador de dano nas culturas celulares, mais estudos precisam ser realizados acompanhando as linhagens por mais tempo afim de concluir qual é mais suscetível aos danos causados pelo vírus.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Krumbholz A, Bininda-Emonds OR, Wutzler P, Zell R. Phylogenetics, evolution, and medical importance of polyomaviruses. *Infect Genet Evol.* 2009;9;5:784-99.
- 2 - Johne R, Buck CB, Allander T, Atwood WJ, Garcea RL, Imperiale MJ, Major EO, Ramqvist T, Norkin LC. Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Arch Virol*, 2011;156:1627- 34.
- 3 - Calvignac-Spencer S, Feltkamp MCW, Daugherty MD, Moens U, Ramqvist T, Johne R and Ehlers B. A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Arch Virol.* 2016. DOI 10.1007/s00705-016-2794-y.
- 4 - Moens U, Krumbholz A, Ehlers B, Zell R, Johne R, Calvignac-Spencer S, Lauber C. Biology, evolution, and medical importance of polyomaviruses: An update. *Infect Genet Evol.* 2017;54:18-38
- 5 – Chang, D., Haynes, J.I., 2nd, Brady, J.N. and Consigli, R.A. Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. *Virology* 1992;191:978-983
- 6 - Khalili K. Human neurotropic JC virus and its association with brain tumors. *Dis Markers.* 2001;17;3:143-7.
- 7 - Sweet BH, Hilleman MR. "The vacuolating virus, S.V. 40". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1960;105:420–427.
- 8 - Frederik A. Murphy, Claude M. Fauquet, David H.L. Bishop, Said A. Ghabrial, Audrey W. Jarvis, Giovanni P. Martelli, Mike A. Mayo, Max D. Summers. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses.* 8th ed. Academic Press; 2005. Polyomavirus; p. 231
- 9 - Randhawa PS, Vats A, Zygmunt D, Swalsky P, Scantlebury V, Shapiro R, Finkelstein S. Quantitation of viral DNA in renal allograft tissue from patients with BK virus nephropathy. *Transplantation.* 2002;74;4:485-488
- 10 – 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;3:384-93
- 11 - Eddy, BE, Borman, GS, Grubbs, GE, Young, RD. "Identification of the oncogenic substance in rhesus monkey kidney cell culture as simian virus 40". *Virology* 1962;17:65–75
- 12 - Gross, L. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1953;83;2:414-421.
- 13 - Poulin DL, DeCaprio JA (2006). "Is there a role for SV40 in human cancer?". *J. Clin. Oncol.* 24 (26): 4356–65.
- 14 – Butel JS, Vilchez RA, Jorgensen JL, Kozinetz CA. Association between SV40 and non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2003;44;3:S33-S39.
- 15 – Vilchez RA e Butel JS. SV40 in human brain cancers and non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene.* 2003;22;33:5164-72.

- 16 – Atkin SJ, Griffin BE, Dilworth SM. Polyoma virus and simian virus 40 as cancer models: history and perspectives. *Semin Cancer Biol.* 2009;19;4:211-7
- 17 - Gardner SD, Field AM, Coleman DV, et al. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet.* 1971;297:7712:1253-1257.
- 18 - Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis* 2003;3:611-23.
- 19 – Zu Rhein G. M. and Chou S. M. Particles resembling papovaviruses in human cerebral demyelinating disease. *Science.* 1965;148:1477–1479
- 20 - Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet.* 1971;1:7712:1257-60.
- 21 - Astrom KE, Mancall EL, Richardson EP Jr. Progressive multifocal leuko-encephalopathy: a hitherto unrecognized complication of chronic lymphatic leukaemia and Hodgkin's disease. *Brain* 1958;81:93–111
- 22 – Berger JR, Chauhan A, Galey D, Nath A. Epidemiological evidence and molecular basis of interactions between HIV and JC virus. *J. Neurovirol.* 2001;7:329-338.
- 23 – Major EO, Amemiya K, Tornatore CS, Houff SA, Berger JR. Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin. Microbiol.* 1992;5:49-73.
- 24 – Berger JR. Progressive multifocal leukoencephalopathy in acquired immunodeficiency syndrome explaining the high incidence and disproportionate frequency of the illness relative to others immunosuppressive conditions. *J. Neurovirol.* 2003;9;1:38-41
- 25 – Boldorini R, Pagani E, Car PG, Omodeo-Zorini E, Borghi E, Tarantini L, Bellotti C, Ferrante P, Monga G. Molecular characterisation of JC virus strains detected in human brain tumours. *Pathology.* 2003;35;3:248-53.
- 26 - Bozic C, Subramanyam M, Richman S, et al. Anti-JC virus (JCV) antibody prevalence in the JCV Epidemiology in MS (JEMS) trial. *Eur J Neurol.* 2014;21;2:299–304. 10.1111/ene.12304
- 27 – Fink MC, Penalva de Oliveira AC, Milagres FA, Vidal JE, Picerno-Pouza AF, Duarte Neto A, Pannuti CS. JC virus DNA in cerebrospinal fluid samples from Brazilian AIDS patients with focal brain lesions without mass effect. *J Infect.* 2006;52;1:30-6
- 28 – Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Fink MC, Pannuti CS, Trujillo JR. Aids-related progressive multifocal leukoencephalopathy: a retrospective study in a referral center in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008;50;4:209-12.
- 29 - Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, et al. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* 2007;3;5:e64.
- 30 - Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, et al. Identification of a third human polyomavirus. *Journal of Virology.* 2007; 81:4130–4136.
- 31 – Csoma E, Mészáros B, Asztalos L, Gergely L. WU and KI polyomaviruses in respiratory, blood and urine samples from renal transplant patients. *J Clin Virol.* 2015;64:28-33.

- 32 - Lemos BD, Storer BE, Iyer JG, Phillips JL, Bichakjian CK, Fang LC, et al. Pathologic nodal evaluation improves prognostic accuracy in Merkel cell carcinoma: analysis of 5823 cases as the basis of the 1st consensus staging system. *J Am Acad Dermatol* 2010;63:751–761
- 33 - Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*. 2008;319:1096–1100
- 34 - Hashida Y, Nakajima K, Nakajima H, Shiga T, Tanaka M, Murakami M, Matsuzaki S, Naganuma S, Kuroda N, Seki Y, Katano H, Sano S, Daibata M. High load of Merkel cell polyomavirus DNA detected in the normal skin of Japanese patients with Merkel cell carcinoma. *J Clin Virol*. 2016;82:101-7.
- 35 - 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;6:509-15.
- 36 - van der Meijden E, Janssens RW, Lauber C, BouwesBavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MC. Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog*. 2010 6;7:e1001024.
- 37 - Scuda N, Hofmann J, Calvignac-Spencer S, Ruprecht K, Liman P, Kuhn J, et al. A novel human polyomavirus closely related to the African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *J Virol*. 2011;85;9:4586–90
- 38 - Buck CB, Phan GQ, Raiji MT, Murphy PM, McDermott DH, McBride AA. Complete genome sequence of a tenth human polyomavirus. *J Virol*. 2012;86;19:10887
- 39 - Siebrasse EA, Bauer I, Holtz LR, Le BM, Lassa-Claxton S, Canter C, Hmiel P, Shenoy S, Sweet S, Turmelle Y, Shepherd R, Wang D. Human polyomaviruses in children undergoing transplantation, United States, 2008-2010. *Emerg Infect Dis*. 2012;18;10:1676-9.
- 40 - Yu G, Greninger AL, Isa P, Phan TG, Martínez MA, de la Luz Sanchez M, Contreras JF, Santos-Preciado JI, Parsonnet J, Miller S, DeRisi JL, Delwart E, Arias CF, Chiu CY. Discovery of a novel polyomavirus in acute diarrheal samples from children. *PLoS One*. 2012;7;11:e49449
- 41 - Korup S, Rietscher J, Calvignac-Spencer S, Trusch F, Hofmann J, Moens U, Sauer I, Voigt S, Schmuck R, Ehlers B. Identification of a novel human polyomavirus in organs of the gastrointestinal tract. *PLoS One*. 2013;8;3:e58021.
- 42 - Lim ES, Reyes A, Antonio M, Saha D, Ikumapayi UN, Adeyemi M, Stine OC, Skelton R, Brennan DC, Mkakosya RS, Manary MJ, Gordon JI, Wang D. Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology*. 2013;436;2:295-303
- 43 - Mishra N, Pereira M, Rhodes RH, An P, Pipas JM, Jain K, Kapoor A, Briesse T, Faust PL, Lipkin WI. Identification of a Novel Polyomavirus in a Pancreatic Transplant Recipient With Retinal Blindness and Vasculitic Myopathy. *J Infect Dis*. 2014;210;10:1595–1599.
- 44 - ICTV online. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/dsdna-viruses/w/polyomaviridae; acesso em dez, 2017.
- 45 - Bialasiewicz S, Byrom L, Fraser C, Clark J. Potential Route of Transmission for Trichodysplasia Spinulosa Polyomavirus. *J Infect Dis*. 2017. doi: 10.1093/infdis/jix078

- 46 - McLaughlin-Drubin ME and Munger K. Viruses Associated with Human Cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1782;3:127–150.
- 47 - Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*, 1964;1:702–703
- 48 - Shafritz DA and Kew MC. Identification of integrated hepatitis B virus DNA sequences in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology*. 1981;1;1:1-8.
- 49 - El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2012;142:1264-1273
- 50 - Nobbenhuis MA, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet*. 1999;354:20–5.
- 51 - Gallo, R.C. Human retroviruses after 20 years: A perspective from the past and prospects for their future control. *Immunol. Rev.* 2002;185:236–265
- 52 - Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980;77:7415–7419
- 53 - Wang HW, Trotter MWB, Lagos D, et al. Kaposi sarcoma herpesvirus-induced cellular reprogramming contributes to the lymphatic endothelial gene expression in Kaposi sarcoma. *Nat Genet*. 2004;36:687–693.
- 54 - Wyatt AJ, Sachs DL, Shia J, Delgado R, Busam KJ. Virus-associated trichodysplasia spinulosa. *Am J Surg Pathol*. 2005;29;2:241-246.
- 55 - Matthews MR, Wang RC, Reddick RL, Saldivar VA, Browning JC. Viral-associated trichodysplasia spinulosa: a case with electron microscopic and molecular detection of the trichodysplasia spinulosa-associated human polyomavirus. *J Cutan Pathol*. 2011;38;5:420-31
- 56 – WHO HPV – Disponível em: <http://www.who.int/bulletin/volumes/85/9/06-038414/en/> ; acesso em Dez, 2017
- 57 – D'Souza G, Fakhry C, Sugar EA, Seaberg EC, Weber K, Minkoff HL, Anastos K, Palefsky JM, Gillison ML. Six-month natural history of oral versus cervical human papillomavirus infection. *Int J Cancer*. 2007;121;1:143-150.
- 58 – da Silva CE, da Silva ID, Cerri A, Weckx LL. Prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;104;4:497-500
- 59 – Schiller JT, Castellsagué X, Villa LL, Hildesheim A. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine*. 2008;26S:K53-K61.
- 60 – de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, Tous S, Felix A, Bravo LE, Shin HR, Vallejos CS, de Ruiz PA, Lima MA, Guimera N, Clavero O, Alejo M, Llombart-Bosch A, Cheng-Yang C, Tatti SA, Kasamatsu E, Iljazovic E, Odida M, Prado R, Seoud M, Gree M, Usulutun A, Jain A, Suarez GA, Lombardi LE, Banjo A, Menéndez C, Domingo EJ, Velasco J, Nessa A, Chichareon SC, Qiao YL, Lerma E, Garland SM, Sasagawa T, Ferrera A, Hammouda D, Mariani L, Pelayo A, Steiner I, Oliva E, Meijer CJ, Al-Jassar WF, Cruz E, Wright TC, Puras A, Llave CL, Tzardi M, Agorastos T, Garcia-Barriola V, Clavel C, Ordi J, Andújar M, Castellsagué X, Sánchez GI, Nowakowski AM, Bornstein J, Muñoz N, Bosch FX; Retrospective International Survey and HPV

Time Trends Study Group. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010;11;11:1048-1056

61 - Li J, Zhang D, Zhang Y, Wang X, Lin Y, Hu L. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus in women with cervical cancer or high-grade precancerous lesions in Chengdu, western China. *Int J Gynaecol Obstet.* 2011;112;2:131-134

62 – Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002;2;5:342-350.

63 – Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science.* 2008;319;5866:1096-1100.

64 – White MK, Gordon J, Khalili K. 2013 The rapidly expanding family of human polyomaviruses: recent developments in understanding their life cycle and role in human pathology. *PLoS Pathog.* 9(3):e1003206.

65 – Emerson LL, Carney HM, Layfield LJ, Sherbotie JR. Collecting duct carcinoma arising in association with BK nephropathy post-transplantation in a pediatric patient. A case report with immunohistochemical and in situ hybridization study. *Pediatr Transplant.* 2008;12;5:600-605

66 – Giraud G, Ramqvist T, Ragnarsson-Olding B, Dalianis T. DNA from BK virus and JC virus and from KI, WU, and MC polyomaviruses as well as from simian virus 40 is not detected in non-UV-light-associated primary malignant melanomas of mucous membranes. *J Clin Microbiol.* 2008;46;11:3595-3598.

67 – Abend JR, Low JA, Imperiale MJ. Global effects of BKV infection on gene expression in human primary kidney epithelial cells. *Virology.* 2010;397;1:73-79.

68 - Bouvard V, Baan RA, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Straif K. WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Carcinogenicity of malaria and of some polyomaviruses. *Lancet Oncology.* 2012;13;4:339–340

69 – Duncavage EJ, Le BM, Wang D, Pfeifer JD. Merkel cell polyomavirus: a specific marker for Merkel cell carcinoma in histologically similar tumors. *Am J Surg Pathol.* 2009;33;12:1771-1777.

70 – Sharp CP, Norja P, Anthony I, Bell JE, Simmonds P. Reactivation and mutation of newly discovered WU, KI, and Merkel cell carcinoma polyomaviruses in immunosuppressed individuals. *J Infect Dis.* 2009;199;3:398-404.

71 – Pastrana DV, Tolstov YL, Becker JC, Moore PS, Chang Y, Buck CB. Quantitation of human seroresponsiveness to Merkel cell polyomavirus. *PLoS Pathog.* 2009;5;9:e1000578.

72 – Koljonen V, Kukko H, Pukkala E, Sankila R, Böhling T, Tukiainen E, Sihto H, Joensuu H. Chronic lymphocytic leukaemia patients have a high risk of Merkel-cell polyomavirus DNA-positive Merkel-cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2009;101;8:1444-1447

73 – Koljonen V, Kukko H, Tukiainen E, Böhling T, Sankila R, Joensuu H, Pukkala E. Second cancers following the diagnosis of Merkel cell carcinoma: a nationwide cohort study. *Cancer Epidemiol.* 2010;34;1:62-65

74 – Pantulu ND, Pallasch CP, Kurz AK, Kassem A, Frenzel L, Sodenkamp S, Kvasnicka HM, Wendtner CM, Zur Hausen A. Detection of a novel truncating Merkel cell polyomavirus large T antigen deletion in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* 2010;116;24:5280-5284.

- 75 – Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene*. 2006;25;38:5220-5227.
- 76 – Wu JH, Simonette RA, Nguyen HP, Rady PL, Tying SK. Molecular mechanisms supporting a pathogenic role for human polyomavirus 6 small T antigen: Protein phosphatase 2A targeting and MAPK cascade activation. *J Med Virol*. 2017;89;4:742-747
- 77 - Dimova DK, Dyson NJ. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene*. 2005;24;17:2810-2826.
- 78 - Hitchens MR, Robbins PD. The role of the transcription factor DP in apoptosis. *Apoptosis*. 2003;8;5:461-468.
- 79 – Nguyen HT, Hong X, Tan S, Chen Q, Chan L, Fivaz M, Cohen SM, Voorhoeve PM. Viral small T oncoproteins transform cells by alleviating hippo-pathway-mediated inhibition of the YAP proto-oncogene. *Cell Rep*. 2014;8;3:707-713
- 80 – Wu JH, Simonette RA, Nguyen HP, Doan HQ, Rady PL, Tying SK. Emerging differential roles of the pRb tumor suppressor in trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus and Merkel cell polyomavirus pathogenesis. *J Clin Virol*. 2016;76:40-43.
- 81 – Kazem S, van der Meijden E, Wang RC, Rosenberg AS, Pope E, Benoit T, Fleckman P, Feltkamp MC. Polyomavirus-associated Trichodysplasia spinulosa involves hyperproliferation, pRB phosphorylation and upregulation of p16 and p21. *PLoS One*. 2014;9;10:e108947.
- 82 – Sablina AA, Hahn WC. SV40 small T antigen and PP2A phosphatase in cell transformation. *Cancer Metastasis Rev*. 2008;27;2:137-146
- 83 - Garriga J, Jayaraman AL, Limón A, Jayadeva G, Sotillo E, Truongcao M, Patsialou A, Wadzinski BE, Graña X. A dynamic equilibrium between CDKs and PP2A modulates phosphorylation of pRB, p107 and p130. *Cell Cycle*. 2004;10:1320-1330.
- 84 - van der Meijden E, Kazem S, Dargel CA, van Vuren N, Hensbergen PJ, Feltkamp MC. Characterization of T Antigens, Including Middle T and Alternative T, Expressed by the Human Polyomavirus Associated with Trichodysplasia Spinulosa. *J Virol*. 2015;18:9427-39.
- 85 – Corbeil HB, Branton PE. Characterization of an E2F-p130 complex formed during growth arrest. *Oncogene*. 1997;15;6:657-668.
- 86 - Leoncini L, Bellan C, Cossu A, Claudio PP, Lazzi S, Cinti C, Cevenini G, Megha T, Laurini L, Luzi P, Orcioni GF, Piccioli M, Pileri S, Giardino C, Tosi P, Giordano A. Retinoblastoma-related p107 and pRb2/p130 proteins in malignant lymphomas: distinct mechanisms of cell growth control. *Clin Cancer Res*. 1999;12:4065-72.
- 87 - Gerdes J; Schlueter CLL, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad H. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol*. 1991;238:867-73.
- 88 - Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M. The cell cycle associated a change of the Ki-67 nuclear antigen expression. *J Cell Physiol* 1987;133:579-84.
- 89 - Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J. Cell. Physiol*. 2006;206;3:624–35

- 90 – Kazem S, Lauber C, van der Meijden E, Kooijman S, Kravchenko AA; TrichSpin Network, Feltkamp MC, Gorbalenya AE. Limited variation during circulation of a polyomavirus in the human population involves the COCO-VA toggling site of Middle and Alternative T-antigen(s). *Virology*. 2016;487:129-140.
- 91 - Caspar DL, Klug A. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1962;27:1-24.
- 92 - Belnap DM, Olson NH, Cladel NM, Newcomb WW, Brown JC, Kreider JW, Christensen ND, Baker TS. Conserved features in papillomavirus and polyomavirus capsids. *J Mol Biol*. 1996;7;259;2:249-263
- 93 - Fields BN, Knipe DM, Howley PM. 2013. *Fields virology*, Philadelphia, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health.
- 94 – Stehle T, Gamblin SJ, Yan Y, Harrison SC. The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure*. 1996;4;2:165-182.
- 95 – van der Meijden E, Kazem S, Burgers MM, Janssens R, Bouwes Bavinck JN, de Melker H, Feltkamp MC. Seroprevalence of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. *Emerg Infect Dis*. 2011;17;8:1355-1363
- 96 - Gjoerup O, Chang Y. Update on human polyomaviruses and cancer. *Adv Cancer Res*. 2010;106:1-51
- 97 - Seif R. Polyoma virus middle t antigen: a tumor progression factor. *J Virol*. 1980;35;2:479-87.
- 98 - Pérez L, Urich M, Paasinen A, Senften M, Meili R, Ballmer-Hofer K. Domains in middle-T antigen that cooperate in polyomavirus-mediated oncogenic transformation. *Virology*. 1995;208;1:26-37.
- 99 – Tan CS, Ellis LC, Wüthrich C, Ngo L, Broge TA Jr, Saint-Aubyn J, Miller JS, Korálník IJ. JC virus latency in the brain and extraneural organs of patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol*. 2010;84;18:9200-9209
- 100 – Reid CE, Li H, Sur G, Carmillo P, Bushnell S, Tizard R, et al. Sequencing and analysis of JC virus DNA from natalizumab-treated PML patients. *J Infect Dis* 2011;204:237–44.
- 101 - Saribas AS, Coric P, Hamazaspyan A, Davis W, Axman R, White MK, Abou-Gharbia M, Childers W, Condra JH, Bouaziz S, Safak M. Emerging From the Unknown: Structural and Functional Features of Agnoprotein of Polyomaviruses. *J Cell Physiol*. 2016;1;10:2115-27.
- 102 - Gerits N, Johannessen M, Tümmler C, Walquist M, Kostenko S, Snapkov I, van Loon B, Ferrari E, Hübscher U, Moens U. Agnoprotein of polyomavirus BK interacts with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication. *Virol J*. 2015;12:7
- 103 - Starzl; et al. Liver transplantation with use of cyclosporin a and prednisone. *N Engl J Med* 1981;305;5:266–269.
- 104 – Izakovic J, Büchner SA, Düggelein M, Guggenheim R, Itin PH. [Hair-like hyperkeratoses in patients with kidney transplants. A new cyclosporin side-effect]. *Hautarzt*. 1995;46;12:841-846.
- 105 – Haycox CL, Kim S, Fleckman P, Smith LT, Piepkorn M, Sundberg JP, Howell DN, Miller SE. Trichodysplasia spinulosa--a newly described folliculocentric viral infection in an immunocompromised host. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 1999;4;3:268-271.

- 106 – Tan BH, Busam KJ. Virus-associated Trichodysplasia spinulosa. *Adv Anat Pathol*. 2011;18;6:450-453.
- 107 – Fischer MK, Kao GF, Nguyen HP, Drachenberg CB, Rady PL, Tyring SK, Gaspari AA. Specific detection of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus DNA in skin and renal allograft tissues in a patient with trichodysplasia spinulosa. *Arch Dermatol*. 2012;148;6:726-733
- 108 – Kazem S, van der Meijden E, Kooijman S, Rosenberg AS, Hughey LC, Browning JC, Sadler G, Busam K, Pope E, Benoit T, Fleckman P, de Vries E, Eekhof JA, Feltkamp MC. Trichodysplasia spinulosa is characterized by active polyomavirus infection. *J Clin Virol*. 2012;53;3:225-230
- 109 - Urbano PR, Pannuti CS, Pierrotti LC, David-Neto E, Romano CM. Rapid detection of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in skin biopsy specimen. *Genome Announc*. 2014;2;4:pii: e00694-14.
- 110 – Van Ghelue M, Khan MT, Ehlers B, Moens U. Genome analysis of the new human polyomaviruses. *Rev Med Virol*. 2012;22;6:354-377
- 111 - Sadler GM, Halbert AR, Smith N, Rogers M. Trichodysplasia spinulosa associated with chemotherapy for acute lymphocytic leukaemia. *Australasian Journal of Dermatology*. 2007;48:110–114
- 112 - Rahiala J, Koskenvuo M, Sadeghi M, Waris M, Vuorinen T, Lappalainen M, Saarinen-Pihkala U, Allander T, Söderlund-Venermo M, Hedman K, Ruuskanen O, Vetteranta K. Polyomaviruses BK, JC, KI, WU, MC, and TS in children with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Transplant*. 2016 May;20(3):424-31.
- 113 – Schwieger-Briel A, Balma-Mena A, Ngan B, Dipchand A, Pope E. Trichodysplasia spinulosa--a rare complication in immunosuppressed patients. *Pediatr Dermatol*. 2010;27;5:509-513
- 114 – Feltkamp MC, Kazem S, van der Meijden E, Lauber C, Gorbalenya AE. From Stockholm to Malawi: recent developments in studying human polyomaviruses. *J Gen Virol*. 2013;94;Pt 3:482-96
- 115 - Urbano PR, Nali LH, Bicalho CS, Pierrotti LC, David-Neto E, Pannuti CS, Romano CM. New findings about Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (TSPyV) -novel qPCR detects TSPyV-DNA in blood samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;84;2:123-124
- 116 – Schaffer K, Sheehy N, Coughlan S, Bergin C, Hall WW. JC virus in the Irish population: significant increase of genotype 2 in immunocompromised individuals. *J Neurovirol* 2006;12;1:39-46.
- 117 - Lee JS, Frederiksen P, Kossard S. Progressive trichodysplasia spinulosa in a patient with chronic lymphocytic leukaemia in remission. *Australasian Journal of Dermatology*. 2008;49:57–60
- 118 – Zhong S, Zheng HY, Suzuki M, Chen Q, Ikegaya H, Aoki N, Usuku S, Kobayashi N, Nukuzuma S, Yasuda Y, Kuniyoshi N, Yogo Y, Kitamura T. Age-related urinary excretion of BK polyomavirus by nonimmunocompromised individuals. *J Clin Microbiol*. 2007;45;1:193-198
- 119 - Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, Gosert R, Hirsch HH. Prevalence of Polyomavirus BK and JC Infection and Replications in 400 Healthy Blood Donors. *The Journal of Infectious Diseases*. 2009;199;6:837-846
- 120 – van der Meijden E, Bialasiewicz S, Rockett RJ, Tozer SJ, Sloots TP, Feltkamp MC. Different serologic behavior of MCPyV, TSPyV, HPyV6, HPyV7 and HPyV9 polyomaviruses found on the skin. *PLoS One*. 2013;8;11:e81078

- 121 - Chen T, Tanner L, Simell V, Hedman L, Makinen, M., Sadeghi, M., Veijola, R., Hyoty, H., Ilonen, J., Knip, M., Toppari, J., Simell, O., Soderlund-Venermo, M. & Hedman, K. Diagnostic methods for and clinical pictures of polyomavirus primary infections in children, Finland. *Emerg Infect Dis.* 2014;20:689-92
- 122 - 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;204:1523–1526.
- 123 – Wieland U, Silling S, Hellmich M, Potthoff A, Pfister H, Kreuter A. Human polyomaviruses 6, 7, 9, 10 and Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in HIV-infected men. *J Gen Virol.* 2014;95;Pt 4:928-932.
- 124 – Ruskowski, L. Avaliação dos métodos de ultracentrifugação e adsorção-eluição para concentração viral em amostras de água. Monografia (Trabalho de Conclusão do curso de Biomedicina)- Universidade Feevale, Novo Hamburgo-RS, 2015.
- 125 - Bartlett JMS and Stirling D. "A Short History of the Polymerase Chain Reaction". *PCR Protocols. Methods in Molecular Biology.* 2003;2;226:3–6.
- 126 - Kubista, M; Andrade, JM; Bengtsson, M; Forootan, A; Jonak, J; Lind, K; Sindelka, R; Sjoberg, R; Sjogreen, B; Strombom, L; Stahlberg, A; Zoric, N. "The real-time polymerase chain reaction". *Mol Aspects Med.* 2006;27;2-3: 95–125.
- 127 - Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments". *Clinical Chemistry.* 2009;55;4:611–22
- 128 - CLSI EP 17-A guideline : Clinical Laboratory and Standards Institute, 2012.
- 129 - Sanger F; Coulson AR. "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase". *J. Mol. Biol.* 1975;94;3:441–8.
- 130 - Sanger F; Nicklen S; Coulson AR. "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977;74;12:5463–5467.
- 131 – (Protocolo descrito pela QIAGEN – FAQ ID 2953, modificado – disponível no domínio: <https://www.qiagen.com/at/resources/faq?id=5cf3006a-c63f-48d6-89d9-9ae14329c230&lang=en>).
- 132 - Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215;3:403-410
- 133 – Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 1998;8;3:175-85
- 134 – Desmyter J, Melnick JL, Rawls WE. Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J Virol.* 1968;2;10:955-61.
- 135 – de Oña M, Melón S, de la Iglesia P, Hidalgo F, Verdugo AF. Isolation of influenza virus in human lung embryonated fibroblast cells (MRC-5) from clinical samples. *J Clin Microbiol.* 1995;33;7:1948-1949.

- 136 – Hull RN, Cherry WR, Tritch OJ. Growth characteristics of monkey kidney cell strains LLC-MK1, LLC-MK2, and LLC-MK2(NCTC-3196) and their utility in virus research. *J Exp Med*. 1962;115:903-918.
- 137 - Schepetiuk SK, Kok T. The use of MDCK, MEK and LLC-MK2 cell lines with enzyme immunoassay for the isolation of influenza and parainfluenza viruses from clinical specimens. *J Virol Methods*. 1993;42;2-3:241-250.
- 138 – D'Angelo LJ, Hierholzer JC, Holman RC, Smith JD. Epidemic keratoconjunctivitis caused by adenovirus type 8: epidemiologic and laboratory aspects of a large outbreak. *Am J Epidemiol*. 1981;113;1:44-9.
- 139 - Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002
- 140 – Sadeghi M, Aronen M, Chen T, Jartti L, Jartti T, Ruuskanen O, Söderlund-Venermo M, Hedman K. Merkel cell polyomavirus and trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus DNAs and antibodies in blood among the elderly. *BMC Infect Dis*. 2012;12:383.
- 141 - Rockett RJ, Sloots TP, Bowes S, O'Neill N, Ye S, Robson J, Whitley DM, Lambert SB, Wang D, Nissen MD, Bialasiewicz S. Detection of novel polyomaviruses, TSPyV, HPyV6, HPyV7, HPyV9 and MWPyV in feces, urine, blood, respiratory swabs and cerebrospinal fluid. *PLoS One*. 2013;8;5:e62764
- 142 - Fukumoto H, Li TC, Kataoka M, Hasegawa H, Wakita T, Saeki H, Suzuki T, Katano H. Seroprevalence of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in Japan. *J Clin Virol*. 2015;65:76-82.
- 143 – Delbue S, Guerini FR, Mancuso R, Caputo D, Mazziotti R, Saresella M, Ferrante P. JC virus viremia in interferon-beta -treated and untreated Italian multiple sclerosis patients and healthy controls. *J Neurovirol*. 2007;13;1:73-77.
- 144 – Hussein MI, Anastasi B, Singer J, Lacey SF. A comparative study of Merkel cell, BK and JC polyomavirus infections in renal transplant recipients and healthy subjects. *J Clin Virol* 2010;49:137–140
- 145 - Boukoum H, Nahdi I, Sahtout W, Skiri H, Segondy M, Aouni M. BK and JC virus infections in healthy patients compared to kidney transplant recipients in Tunisia. *Microb Pathog*. 2016;97:204-8.
- 146 – Bicalho CS, Oliveira RR, Pierrotti LC, Fink MC, Urbano PR, Nali LH, Luna EJ, Romano CM, David DR, David-Neto E, Pannuti CS. Pre-transplant shedding of BK virus in urine is unrelated to post-transplant viruria and viremia in kidney transplant recipients. *Clin Transplant*. 2016;30;7:796-801.
- 147 – Machado DM, Fink MC, Pannuti CS, Succi RC, Machado AA, Carmo FB, Gouvêa Ade F, Urbano PR, Beltrão SV, Santos IC, Machado CM. Human polyomaviruses JC and BK in the urine of Brazilian children and adolescents vertically infected by HIV. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106;8:931-5.
- 148 – Ledesma J, Muñoz P, Garcia de Viedma D, Cabrero I, Loeches B, Montilla P, Gijon P, Rodriguez-Sanchez B, Bouza E; BKV Study Group. BK virus infection in human immunodeficiency virus-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31;7:1531-1535.
- 149 - Robaina TF, Mendes GS, Benati FJ, Pena GA, Silva RC, Montes MA, Otero R, Castro GF, Câmara FP, Santos N. Polyomavirus in saliva of HIV-infected children, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2013;19;1:155-7.

- 150 – Castro T, Fink MCD, Figueiredo M, Braz-Silva PH, Pannuti CM, Ortega KL, Gallottini M. Polyomavirus BK and JC in individuals with chronic kidney failure, kidney transplantation, and healthy controls. *J Clin Virol.* 2017;89:5-9
- 151 – Gard L, Niesters HG, Riezebos-Brilman A. A real time genotyping PCR assay for polyomavirus BK. *J Virol Methods.* 2015;221:51-56.
- 152 – Rodrigues C, Pinto D, Medeiros R. Molecular epidemiology characterization of the urinary excretion of polyomavirus in healthy individuals from Portugal--a Southern European population. *J Med Virol.* 2007;79;8:1194-1198.
- 153 - Nali LH, Centrone Cde C, Urbano PR, Penalva-de-Oliveira AC, Vidal JE, Miranda EP, Pannuti CS, Fink MC. High prevalence of the simultaneous excretion of polyomaviruses JC and BK in the urine of HIV-infected patients without neurological symptoms in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2012;54;4:201-205.
- 154 – Fink MC, de Oliveira AC, Romano CM, Vidal JE, Urbano PR, Tateno AF, Oliveira CM, de Albuquerque Luna EJ, Pannuti CS. Molecular characterization of human polyomavirus JC in Brazilian AIDS patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Clin Virol.* 2010;48;1:6-10.
- 155 - 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;6:633-637.
- 156 - Urbano PR, Oliveira RR, Romano CM, Pannuti CS, Fink MC. Occurrence, genotypic characterization, and patterns of shedding of human polyomavirus JCPyV and BKPyV in urine samples of healthy individuals in São Paulo, Brazil. *J Med Virol.* 2016;88;1:153-158.
- 157 - Hussain I, Tasneem F, Umer M, Pervaiz A, Raza M, Arshad MI, Shahzad N. Specific and quantitative detection of Human polyomaviruses BKPyV and JCPyV in the healthy Pakistani population. *Virol J.* 2017;14;1:86.
- 158 – Park S, Kim YW, Lee YJ, Park KM, Park JH, Kim BM, Park BS. Polyomavirus Nephropathy in Native Kidneys of an Immunocompetent Individual. *Am J Case Rep.* 2017;18:498-501
- 159 - Essa S, Chehadeh W, Al-Nakib W. Human Polyomavirus WU in Patients with Respiratory Tract Infection in Kuwait. *Med Princ Pract.* 2017. doi: 10.1159/000485036.
- 160 - Elia F, Villani S, Ambrogio F, Signorini L, Dallari S, Binda S, Primache V, Pellegrinelli L, Ferrante P, Delbue S. JC virus infection is acquired very early in life: evidence from a longitudinal serological study. *J Neurovirol.* 2017;23;1:99-105.
- 161 - Hennes EM, Kornek B, Huppke P, Reindl M, Rostasy K, Berger T. Age-Dependent Seroprevalence of JCV Antibody in Children. *Neuropediatrics.* 2016;47;2:112-114.
- 162 - Vahabpour R, Aghasadeghi MR, Salehi-Vaziri M, Mohajel N, Keyvani H, Nasimi M, Esghaei M, Monavari SH. Prevalence of Merkel Cell Polyomavirus in Tehran: An Age-Specific Serological Study. *Iran Red Crescent Med J.* 2016;18;5:e26097
- 163 - Vanchiere JA, Abudayyeh S, Copeland CM, Lu LB, Graham DY, Butel JS. Polyomavirus shedding in the stool of healthy adults. *J Clin Microbiol.* 2009;47;8:2388-2391

- 164 - Vanchiere JA, Carillo B, Morrow AL, Jiang X, Ruiz-Palacios GM, Butel JS. Fecal Polyomavirus Excretion in Infancy. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2016;5;2:210-213
- 165 - Campos GS, Albuquerque Bandeira AC, Diniz Rocha VF, Dias JP, Carvalho RH, Sardi SI. First Detection of Chikungunya Virus in Breast Milk. *Pediatr Infect Dis J.* 2017;36;10:1015-1017.
- 166 - Moylan DC, Pati SK, Ross SA, Fowler KB, Boppana SB, Sabbaj S. Breast Milk Human Cytomegalovirus (CMV) Viral Load and the Establishment of Breast Milk CMV-pp65-Specific CD8 T Cells in Human CMV Infected Mothers. *J Infect Dis.* 2017;216;9:1176-1179
- 167 - Sotelo JR, Sotelo AB, Sotelo FJB, Doi AM, Pinho JRR, Oliveira RC, Bezerra AMPS, Deutsch AD, Villas-Boas LS, Felix AC, Romano CM, Machado CM, Mendes-Correa MCJ, Santana RAF, Menezes FG, Manguiera CLP. Persistence of Zika Virus in Breast Milk after Infection in Late Stage of Pregnancy. *Emerg Infect Dis.* 2017;235:856-857
- 168 - Pietrasanta C, Ghirardi B, Manca MF, Uccella S, Gualdi C, Tota E, Pagni L, Mosca F. Herpesviruses and breast milk. *Pediatr Med Chir.* 2014;36;3:5.
- 169 - Louvanto K, Sarkola M, Rintala M, Syrjänen K, Grenman S, Syrjänen S. Breast Milk Is a Potential Vehicle for Human Papillomavirus Transmission to Oral Mucosa of the Spouse. *Pediatr Infect Dis J.* 2017;36;7:627-630.
- 170 - Slyker JA, Richardson B, Chung MH, Atkinson C, Ásbjörnsdóttir KH, Lehman DA, Boeckh M, Emery V, Kiarie J, John-Stewart G. Maternal Highly Active Antiretroviral Therapy Reduces Vertical Cytomegalovirus Transmission But Does Not Reduce Breast Milk Cytomegalovirus Levels. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2017;33;4:332-338
- 171 - Antonsson A, Bialasiewicz S, Rockett RJ, Jacob K, Bennett IC, Sloots TP. Exploring the prevalence of ten polyomaviruses and two herpes viruses in breast cancer. *PLoS One.* 2012;7;8:e39842.
- 172 - Hachana M, Amara K, Ziadi S, Gacem RB, Korbi S, Trimeche M. Investigation of human JC and BK polyomaviruses in breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;133;3:969-77
- 173 - Jeffers LK, Madden V, Webster-Cyriaque J. BK virus has tropism for human salivary gland cells in vitro: implications for transmission. *Virology.* 2009;394;2:183-193
- 174 - Figueiredo MA, Domingues Fink MC, Castro T, Braz-Silva PH, Steffens JC, Eduardo FP, Gallottini M, Ortega KL. Detection of human polyomaviruses JC and BK in liver pretransplant patients. *Oral Dis.* 2017;23;8:1127-1133.
- 175 - Bofill-Mas S, Pina S, & Girones R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Applied and Environment Microbiology.* 2000;66:238–245
- 176 - 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. *Journal of Virology.* 2001;75:10290–10299
- 177 – Hamza IA, Jurzik L, Stang A, Sure K, Uberla K, Wilhelm M. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Water Res.* 2009;43;10:2657-2668

- 178 - Di Bonito P, Libera SD, Petricca S, Iaconelli M, Accardi L, Muscillo M, La Rosa G. Frequent and abundant Merkel cell polyomavirus detection in urban wastewaters in Italy. *Food Environ Virol.* 2015;7;1:1-6.
- 179 - WHO (2011) Guidelines for drinking-water quality -4th ed. Geneva, Switzerland: WHO Press.
- 180 - Vanchiere JA, Nicome RK, Greer JM, Demmler GJ, Butel JS. Frequent detection of polyomaviruses in stool samples from hospitalized children. *J Infect Dis.* 2005;192;4:658-64.
- 181 – Kling CL, Wright AT, Katz SE, McClure GB, Gardner JS, Williams JT, Meinerz NM, Garcea RL, Vanchiere JA. Dynamics of urinary polyomavirus shedding in healthy adult women *J Med Virol.* 2012;84;9:1459-1463.
- 182 - Bofill-Mas S, Pina S, Girones R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl. Environm. Microbiol.* 2000;66:238-245
- 183 - Bofill-Mas S. & Girones R. Excretion and transmission of JCV in human populations. *J. Neurovirol.* 2001;7;345-349.
- 184 - Comerlato J, Souza-Campos F, Souza-Arantes T, Roos-Kulmann MI, Trindade-Oliveira M, Rosado-Spilki F, Guedes-Frazzon AP, Roehe PM and Franco AC. Distribution and genetic diversity of the human polyomaviruses JC and BK in surface water and sewage treatment plant during 2009 in Porto Alegre, Southern Brazil. *Braz. J. Biol.* 2017;77;3:459-468
- 185 - Calgua B, Rodriguez-Manzano J, Hundesa A, Suñen E, Calvo M, Bofill-Mas S, Girones R. New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. *J Virol Methods.* 2003;187;2:215-21
- 186 - Van Der Meijden E, Horváth B, Nijland M, de Vries K, Rácz EK, Diercks GF, de Weerd AE, Claassen-van Groningen MC, van der Blij-de Brouwer CS, van der Zon AJ, Kroes ACM, Hedman K, van Kampen JJA, Riezebos-Brilman A, Feltkamp MCW. Primary Polyomavirus Infection, Not Reactivation, as the Cause of Trichodysplasia Spinulosa in Immunocompromised Patients. *J Infect Dis.* 2017;215;7:1080-1084
- 187 - Kazem S, Lauber C, van der Meijden E, Kooijman S, Kravchenko AA; TrichSpin Network, Feltkamp MC, Gorbalenya AE. Limited variation during circulation of a polyomavirus in the human population involves the COCO-VA toggling site of Middle and Alternative T-antigen(s). *Virology.* 2016;487:129-40
- 188 – Tsuzuki S, Fukumoto H, Mine S, Sato N, Mochizuki M, Hasegawa H, Sekizuka T, Kuroda M, Matsushita T, Katano H. Detection of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in a fatal case of myocarditis in a seven-month-old girl. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7;8:5308-5312. eCollection 2014.
- 189 – Hirsch HH, Randhawa P; AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant.* 2013;13;4:179-188.
- 190 –Karalic D, Lazarevic I, Banko A, Cupic M, Jevtovic D, Jovanovic T. Molecular characterization of BK virus in patients infected with human immunodeficiency virus. *Med Microbiol Immunol.* 2016 Apr;205(2):185-93.
- 191 - Morel V, Martin E, François C, Helle F, Faucher J, Mourez T, Choukroun G, Duverlie G, Castelain S, Brochot E. A Simple and Reliable Strategy for BK Virus Subtyping and Subgrouping. *J Clin Microbiol.* 2017 Apr;55(4):1177-1185.

192 – Buck CB, Van Doorslaer K, Peretti A, Geoghegan EM, Tisza MJ, An P, Katz JP, Pipas JM, McBride AA, Camus AC, McDermott AJ, Dill JA, Delwart E, Ng TF, Farkas K, Austin C, Krabberger S, Davison W, Pastrana DV, Varsani A. The Ancient Evolutionary History of Polyomaviruses. *PLoS Pathog.* 2016;12;4:e1005574

ANEXOS

9. ANEXOS

9.1 – Aprovação do projeto de pesquisa intitulado “Detecção e caracterização molecular dos novos poliomavírus humanos em amostras biológicas provenientes de indivíduos submetidos a imunossupressão” sob o protocolo número 513.805 de 2013.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP										
<p>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</p> <p>Título da Pesquisa: Detecção e caracterização molecular dos novos poliomavírus humanos em amostras biológicas provenientes de indivíduos submetidos a imunossupressão</p> <p>Pesquisador: Camila Malta Romano</p> <p>Área Temática:</p> <p>Versão: 1</p> <p>CAAE: 25238113.7.0000.0068</p> <p>Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P</p> <p>Patrocinador Principal: Financiamento Próprio</p> <p>DADOS DO PARECER</p> <p>Número do Parecer: 513.805</p> <p>Data da Relatoria: 11/12/2013</p> <p>Apresentação do Projeto: O projeto é uma pesquisa sobre a ocorrência dos polyomavírus e sua relação com a imunossupressão.</p> <p>Objetivo da Pesquisa: A pesquisa busca estudar a ocorrência dos vírus WU, KI, MCV, TSV, HPyV6, HPyV7, HPyV9, HPyV10, HPyV12, MWV, MXV e STLPyV em indivíduos saudáveis e em indivíduos imunossuprimidos por medicação ou por infecção do HIV.</p> <p>Avaliação dos Riscos e Benefícios: O risco envolvido na coleta de sangue e de urina dos participantes é baixo e, se confrontado com o benefício das informações obtidas, em nada impede a execução da pesquisa.</p> <p>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O entendimento da prevalência desses vírus na população já será um ganho relevante imediato. Além desse entendimento, o desenvolvimento de técnica padronizada de identificação dos diversos vírus pesquisados nesse projeto poderá ter impacto sobre a elaboração de prognósticos de pacientes imunossuprimidos em diversas situações, o que confere relevância clínica para o resultado dessa pesquisa.</p>										
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td>Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar</td> <td>CEP: 05.403-010</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Cerqueira Cesar</td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td>Município: SAO PAULO</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (11)2661-7585</td> <td>Fax: (11)2661-7585</td> </tr> <tr> <td colspan="2">E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br</td> </tr> </table>	Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar	CEP: 05.403-010	Bairro: Cerqueira Cesar		UF: SP	Município: SAO PAULO	Telefone: (11)2661-7585	Fax: (11)2661-7585	E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br	
Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar	CEP: 05.403-010									
Bairro: Cerqueira Cesar										
UF: SP	Município: SAO PAULO									
Telefone: (11)2661-7585	Fax: (11)2661-7585									
E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br										

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 513.805

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE é bem detalhado e claro o suficiente para o entendimento dos participantes. Esclarece devidamente sobre o armazenamento das amostras e possibilidade de futura utilização.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está em condições de ser aprovado pela comissão por não apresentar problemas relevantes de natureza ética.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12, cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 22 de Janeiro de 2014

Assinador por:
Luiz Eugênio Garcez Leme
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

9.2 – Aprovação do projeto de pesquisa intitulado “Prevalência, caracterização genotípica e determinação da dinâmica de excreção do Poliomavirus humano BK em amostras de urina de indivíduos saudáveis” sob o protocolo número 0032/11 de 2011, o qual foi utilizado as amostras de urina de indivíduos sadios para esse estudo.

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 11/05/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0032/11**, intitulado: **"PREVALÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E DETERMINAÇÃO DA DINÂMICA DE EXCREÇÃO DO POLIOMAVÍRUS HUMANO BK EM AMOSTRAS DE URINA DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS"**, apresentado pelo Departamento de **MEDICINA TROPICAL**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Claudio Sérgio Pannuti**

Pesquisador (a) Executante: **Paulo Roberto Palma Urbano**

CAPPesq, 12 de Maio de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
 Coordenador
 Comissão de Ética para Análise de
 Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492
 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

9.3 – Aprovação do projeto de pesquisa intitulado “Determinação da prevalência e caracterização molecular dos Poliomavirus humanos – BK e JC – em pacientes submetidos a transplante renal” sob o protocolo número 0569/11 de 2011, o qual foi utilizado as amostras de urina de indivíduos submetidos a transplante renal para esse estudo.

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0569/11

Título: DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS POLIOMAVÍRUS HUMANOS - BK E JC- EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE RENAL.

Pesquisador Responsável: Claudio Sérgio Pannuti

Pesquisador Executante: Renato dos Reis Oliveira

Co-autores: Ligia Camera Pierroti, Elias David Neto, Luiz Sergio Azevedo, Maria Cristina Ribeiro de Castro

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Departamento: MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 17/08/2011 o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 18 de Agosto de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

9.4 - Aprovação do projeto de pesquisa intitulado “Infecção pelos Poliomavirus humanos BK e JC em pacientes submetidos a transplante renal: segmento clinico-laboratorial” sob o protocolo número 0234/10 de 2010, o qual foi utilizado as amostras de urina de indivíduos submetidos a transplante renal para esse estudo

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0234/10

Título: INFECÇÃO PELOS POLIOMAVÍRUS HUMANOS BK E JC EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE RENAL: SEGUIMENTO CLÍNICO-LABORATORIAL

Pesquisador Responsável: Lígia Camera Pierrotti, Cristiano Gambá

Pesquisador Executante: Renato dos Reis Oliveira Elias David Neto, Luiz Sérgio Azevedo, Maria Cristina Ribeiro de Castro, Claudio Pannuti

Departamento: MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 17/08/2011, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

• Carta datada de 13.07.11 - Adendo ao protocolo - Solicitação de alteração do fluxo de monitorização das amostras de urina para indicação da coleta de amostras de sangue

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 19 de Agosto de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
Fone: 55 11 3069-6442 ramais 16, 17, 18 e 20 - e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

9.5 - Aprovação do projeto de pesquisa intitulado “Investigação do potencial de transmissão vertical dos poliomavírus ” sob o protocolo número 1.464.831 de 2016, o qual foi utilizado as amostras de leite materno e urina das mães, e salivas dos recém-nascidos provenientes do bio-repositório da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP-USP, aprovadas pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP.

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FMUSP
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP								
<p>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</p> <p>Título da Pesquisa: Investigação do potencial de transmissão vertical dos poliomavírus</p> <p>Pesquisador: Camila Malta Romano</p> <p>Área Temática:</p> <p>Versão: 3</p> <p>CAAE: 48788815.9.0000.0065</p> <p>Instituição Proponente: FUNDACAO FACULDADE DE MEDICINA</p> <p>Patrocinador Principal: Financiamento Próprio</p> <p>DADOS DO PARECER</p> <p>Número do Parecer: 1.464.831</p> <p>Apresentação do Projeto:</p> <p>O objetivo do estudo é verificar a possível transmissão de poliomavírus pela rota vertical. Para isso, o DNA de diferentes vírus da família Poliomaviridae serão investigados por PCR em tempo real em pares mães/RNs através de amostras da mãe do período final pré-gestacional (preferência as semanas compreendidas entre as de número 32 a 36) sendo estas i) urina; ii) saliva e iii) secreção vaginal. Após o parto, no período de até um mês, serão avaliadas: do RN i) Saliva; e da mãe: ii) Leite Materno; iii) urina; iv) saliva e v) secreção vaginal.</p> <p>As amostras de DNA, já extraídas, serão obtidas do Biorrepositório do Projeto BRACHS (aprovado pelo cep da instituição vinculada).</p> <p>Objetivo da Pesquisa:</p> <p>Pesquisar indícios de possíveis mecanismos de transmissão dos poliomavírus atualmente conhecidos no período perinatal. Propomos aqui portanto, a investigação do DNA dos diferentes vírus pertencentes ao grupo dos poliomavírus humanos em amostras biológicas de pares de mães e crianças recém-nascidas, nos períodos pré-gestacionais e pós- natal.</p> <p>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</p> <p>Riscos: Não existem riscos aos participantes, uma vez que nem a obtenção de material biológico</p>								
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="border: none;">Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36</td> <td style="border: none;">CEP: 01.246-903</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Bairro: PACAEMBU</td> <td style="border: none;"></td> </tr> <tr> <td style="border: none;">UF: SP</td> <td style="border: none;">Município: SAO PAULO</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Telefone: (11)3893-4401</td> <td style="border: none;">E-mail: cep.fm@usp.br</td> </tr> </table>	Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36	CEP: 01.246-903	Bairro: PACAEMBU		UF: SP	Município: SAO PAULO	Telefone: (11)3893-4401	E-mail: cep.fm@usp.br
Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36	CEP: 01.246-903							
Bairro: PACAEMBU								
UF: SP	Município: SAO PAULO							
Telefone: (11)3893-4401	E-mail: cep.fm@usp.br							

(...)

**FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP**

Continuação do Parecer: 1.464.831

Outros	CartaencaminhamenMED_Marco2016.pdf	15/03/2016 13:28:56	Camila Malta Romano	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	CartaConcordanciaBiorrep2016.pdf	15/03/2016 13:25:55	Camila Malta Romano	Aceito
Outros	CadastroOnLine.pdf	14/01/2016 15:40:07	Camila Malta Romano	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE_justificativa.pdf	08/12/2015 15:04:37	Camila Malta Romano	Aceito
Outros	AprovacaoCEP_IMT_polyomas.pdf	08/12/2015 15:01:54	Camila Malta Romano	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoInfra.doc	31/08/2015 14:18:37	Camila Malta Romano	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPolioma2015.docx	31/08/2015 14:13:29	Camila Malta Romano	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartaencaminhamenMED.pdf	31/08/2015 14:09:48	Camila Malta Romano	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRostoPolioma.pdf	31/08/2015 14:08:10	Camila Malta Romano	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	CartaaprovacaoCEPBiorrepBraCHS.pdf	27/08/2015 16:52:52	Camila Malta Romano	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	CMV_aprovacaoCEP.pdf	27/08/2015 16:51:53	Camila Malta Romano	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTA_concordanciaVinculada.pdf	27/08/2015 16:49:35	Camila Malta Romano	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

9.6 – Artigo: Urbano PR, Fujita DM, Romano CM. Reemergence of mumps in São Paulo, Brazil - the urgent need for booster shot campaign to prevent a serious infectious disease. 2017. Rev Soc Bras Med Trop. Jul-Aug;50(4):535-538. doi: 10.1590/0037-8682-0320-2016

Rev Soc Bras Med Trop 50(4):535-538, July-August, 2017
doi: 10.1590/0037-8682-0320-2016

Short Communication

Reemergence of mumps in São Paulo, Brazil – the urgent need for booster shot campaign to prevent a serious infectious disease

Paulo Roberto Urbano^[1], Dennis Minoru Fujita^[2] and Camila Malta Romano^{[1],[3]}

[1]. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. [2]. Laboratório de Protozoologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. [3]. Laboratório de Virologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Abstract

Introduction: Neglected infectious diseases like mumps may be opportunistic in controlled areas with low vaccine coverage, particularly in developed and emerging countries. **Methods:** A retrospective analysis of mumps-related data from 2001 to 2016 for São Paulo State, Brazil was conducted. **Results:** From 2014 to 2015, there was an increase of 82% in reported mumps cases in São Paulo, with prevalence of n=49 and 297, respectively in young adults aged 15-29 years. **Conclusions:** A booster-shot campaign on MMR vaccination is recommended to prevent the spread of mumps in unvaccinated children and recipients of only the first dose.

Keywords: Mumps outbreak. São Paulo. Booster shot.

The recent mumps outbreaks in populations considered to have achieved high coverage of the vaccine, particularly in developed and emerging countries, suggest among other reasons a problem related to vaccine acceptance in these nations, which is mainly caused by a failure in booster vaccination and by individual/authorities negligence¹.

The mumps virus (MuV) is a member of the family Paramyxoviridae, subfamily Paramyxoviridae, and the genus *Rubulavirus*. Its negative-sense single-stranded ribonucleic acid (RNA) genome comprises 15,384 nucleotides that encode seven proteins, namely fusion (F) protein, hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein, nucleocapsid-associated protein (NP), phosphoprotein (V/P/I), large (L) protein, small hydrophobic (SH) protein, and matrix (M) protein².

Humans are the only natural host for MuV, although other animal species, such as hamster, mouse, chicken embryo and non-human primates can be infected. However, the infection occurs only in laboratory experiments³. In humans, the incubation period is between 14 and 24 days, being transmissible via saliva droplets in the air from three days before to four days after the onset of parotitis^{4,5}.

MuV is responsible for mumps disease, characterized by unilateral or bilateral swelling of the parotid salivary glands,

usually affecting children and young adolescents. Half of infected individuals develop the classic symptoms, while others may be asymptomatic or develop non-specific respiratory manifestations. The virus can also infect susceptible adults of any age, in whom the consequences can be more severe, leading to hearing loss, orchitis, oophoritis, pancreatitis, and meningo-encephalitis⁶. As a result, an increase in the incidence rates of orchitis may be observed in populations experiencing mumps outbreaks⁷. Among women who acquire mumps during the first trimester of pregnancy, more than 25% suffer a spontaneous abortion. Less common, but equally important, unilateral or bilateral deafness, the worst consequence of the infection may also occur and the rate today is about 1/20,000 cases⁸.

The measles/mumps/rubella (MMR) vaccine contains live and attenuated strains of the measles, mumps, and rubella viruses. A single dose of vaccine is only partially effective (78-92%) against mumps virus, but a second dose can increase this effectiveness to 88-95%⁹. Globally, 290 cases per 100,000 population were reported between 1977 and 1985. With the introduction of the MMR vaccine in the late of 1960s, more than a 90% reduction in the incidence of mumps was achieved. In countries with no vaccination program against mumps, however, its incidence remains high, with epidemic peaks occurring every 2-5 years¹⁰.

Nevertheless, even in countries with vaccination policies, outbreaks are reported every year. Besides the probably low acceptance of vaccine campaigns in some regions, such repeated reemergence of mumps may be attributable to several factors,

Corresponding author: Dra. Camila Malta Romano.

e-mail: cmromano@usp.br

Received 10 August 2016

Accepted 5 April 2017

including the low persistence of protective antibodies, the emergence of new strains capable of evading the vaccine, the difficulties in accessing hard-to-reach populations, the non-vaccination of children or adults motivated by ideological or religious reasons, as well as demographic and economic reasons. In particular, the lack of a booster dose during childhood, the astonishing misinformation about its benefits, and the fear of adverse effects from being vaccinated are among the main reasons that compromise the vaccine coverage for mumps¹¹. As an example, the vaccination denial for children across Europe resulted in 26,000 cases of measles only in 2011⁵.

Additionally, the combination of low or insufficient immunity and the continuous virus importation by travelers may contribute to the reintroduction of viruses in partially susceptible populations.

Brazil's immunization program is one of the most impressive in the world. The country makes most of its own vaccines, which are widely distributed. Since the 1970s, when the national vaccination program started, Brazil has experienced a sharp decline in infant mortality and deaths from infectious diseases¹². Until 2013, the Brazilian vaccination schedule recommended the MMR vaccination of children at 12 months and the second dose in children from 4 to 6 years. A booster was recommended in adolescents 11-19 years of age, and a second booster after 20 years¹³. The 2016 updated schedule, however, recommends the MMR vaccine

be applied at 12 months of age and a second dose at 15 months of age. Two additional boosters shots are indicated before 20 years of age, or a single dose in individuals over 20 years of age¹⁴.

From 2014 to 2015, there was an 82% increase in the number of reported mumps cases in São Paulo State (Figure 1), with the highest incidence in young adults between 15-29 years of age ($n=49$ for 2014, and $n=297$ for 2015). This number is also higher than recorded in the 2003 and 2007/2008 outbreaks, considered as important outbreaks in the country. Although the previous vaccination program was reasonable, the campaigns for vaccination boosters are very ineffective, and only the first dose is usually applied.

The 2016 mumps outbreak appears to be the largest ever recorded in São Paulo in the last 10 years. São Paulo is the most populous state in Brazil and is the most important site of population movement to and from the state. As a consequence, nine Brazilian states recorded mumps outbreaks in 2016. The most affected regions were the South and Southwest regions (Table 1); only Espírito Santo and Rio de Janeiro (RJ) recorded no confirmed case. Probably the outbreak which occurred in 2015 in RJ, together with the implementation of the mass vaccination program in 2015 (that reached ~150,000 individuals), had some impact on the incidence of mumps in the state in 2016. In São Paulo, most cases were reported in people between 20-49 years of age [660 (38.7%) cases] followed by young people aged

FIGURE 1 – The incidence of mumps in São Paulo, Brazil, 2001-2016. Source: SINANW/SINANET/DDTR/CVE/CCD/SES-SP. *SINANET: preliminary data: 25/07/2016.

TABLE 1
Brazilian states and their respective capitals with confirmed cases of mumps, divided by regions.

Mumps: confirmed cases/State – Brazil, 2016				
State	Capital	Region	Confirmed cases*	Cases between 20-29 years of age (%)
Federal District	Brasília	Midwest	1,158	46.1
Goiás	Goiânia	Midwest	71	77.5
Mato Grosso	Cuiabá	Midwest	0	-
Mato Grosso do Sul	Campo Grande	Midwest	0	-
Alagoas	Maceió	Northeast	0	-
Bahia	Salvador	Northeast	73	74
Ceará	Fortaleza	Northeast	0	-
Maranhão	São Luis	Northeast	0	-
Paraíba	João Pessoa	Northeast	0	-
Pernambuco	Recife	Northeast	38	68.4
Piauí	Teresina	Northeast	**	-
Rio Grande do Norte	Natal	Northeast	0	-
Sergipe	Aracaju	Northeast	0	-
Acre	Rio Branco	North	0	-
Amapá	Macapá	North	0	-
Amazonas	Manaus	North	0	-
Pará	Belém	North	0	-
Rondônia	Porto Velho	North	0	-
Roraima	Boa Vista	North	0	-
Tocantins	Palmas	North	0	-
Espírito Santo	Vitória	Southeast	0	-
Minas Gerais	Belo Horizonte	Southeast	400	NA
Rio de Janeiro	Rio de Janeiro	Southeast	0	-
São Paulo	São Paulo	Southeast	1,704	38.7%
Paraná	Curitiba	South	613	NA
Rio Grande do Sul	Porto Alegre	South	113	NA
Santa Catarina	Florianópolis	South	43	NA

NA: data not available *Source: SINANNET - preliminary data - 25/07/2016. **The data available for Teresina is only related to the number of outbreaks (n=40) cities with the larger number of reported cases are in bold font.

15 to 19 years of age [507 (29.7%) cases], thus corroborating the need for a booster dose after childhood as well as the decline in vaccine coverage in the younger population (Table 1).

Several reasons can contribute to the continuous reemergence of mumps, but a definite solution to actually reducing the incidence of this disease is to increase the measures of prevention

and vaccination campaigns in young adults. The 2016 Brazilian vaccination schedule seems to be very effective in the long term, but campaigns dedicated to encouraging adolescents and adults to receive the vaccine boosters are particularly important to prevent contagion among young adults since this age group is currently suffering from the weak immunity induced by a single

dose in the past¹⁵. A mass second dose vaccination campaign is challenging but is the only way to prevent the spread of the virus in unvaccinated children or those who received only the first dose. However, more studies are needed to determine the real reasons for the emergence of outbreaks.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the assistance from *Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo (USP)*, Laboratórios de Investigação Médica LIM - 49/LIM - 52 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina/Universidade de São Paulo and Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) agency.

Conflict of interest

The authors declare that have no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Sabbe M, Vandermeulen C. The resurgence of mumps and pertussis. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(4):955-9.
2. Elango N, Varsanyi TM, Kövamees J, Norrby E. Molecular cloning and characterization of six genes, determination of gene order and intergenic sequences and leader sequence of mumps virus. *J Gen Virol*. 1988;69(11):2893-900.
3. Rubin S, Eckhaus M, Rennick LJ, Bamford CGG, Duprex WP. Molecular biology, pathogenesis and pathology of mumps virus. *J Pathol*. 2015;235(2):242-52.
4. Watson JC, Hadler SC, Dykewicz CA, Reef S, Phillips L. Measles, mumps, and rubella--vaccine use and strategies for elimination of measles, rubella, and congenital rubella syndrome and control of mumps: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 1998;47(RR-8):1-57.
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Increased Transmission and Outbreaks of Measles--European Region, 2011. [Internet]. Weekly. 2011; 60(47):1605-10. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6047a1.htm>
6. Yung CF, Andrews N, Bukasa A, Brown KE, Ramsay M. Mumps complications and effects of mumps vaccination, England and Wales, 2002-2006. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(4):661-7.
7. Davis NF, McGuire BB, Mahon JA, Smyth AE, O'Malley KJ, Fitzpatrick JM. The increasing incidence of mumps orchitis: A comprehensive review. Vol. 105, *BJU Int*. 2010;105(8):1060-5.
8. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. In: Hamborsky J, Kroger A, Wolfe S, editors. 13th edition. Supplement. Washington, D.C.: Public Health Foundation; 2015. 12p.. Available from: <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/mumps.html>
9. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Mumps Vaccination [Internet]. 2016 [cited 2016 Jun 29]. Available from: <http://www.cdc.gov/mumps/vaccination.html>
10. Galazka AM, Robertson SE, Kraigher A. Mumps and mumps vaccine: a global review. *Bull World Health Organ*. 1999;77(1):3-14.
11. Tabacchi G, Costantino C, Napoli G, Marchese V, Cracchiolo M, Casuccio A, et al. Determinants of European parents' decision on the vaccination of their children against measles, mumps and rubella: a systematic review and meta-analysis. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(7):1909-23.
12. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Observações sobre a evolução da mortalidade no Brasil: o passado, o presente e perspectivas. Rio de Janeiro: 2010. 56p.
13. de Martino Mota A, Carvalho-Costa FA. Varicella zoster virus related deaths and hospitalizations in Brazil before the introduction of universal vaccination with the tetraviral vaccine. *J Pediatr*. 2016;92(4):361-6.
14. Ministério da Saúde. Immunization Schedules - Brazil [Internet]. 2016 [cited 2016 Jul 2]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/197-secretaria-svs/13600-calendario-nacional-de-vacinacao>
15. Poscia A, La Milia DI, Lohmeyer F, Teleman AA, de Waure C, Ricciardi W. Sexual behaviours and preconception health in Italian university students. *Ann dell'Istituto Super di Sanità*. 2015;51(2):116-20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26156190>

9.7 – Artigo: Urbano PR, Oliveira AC, Romano CM. Alternative methods for sequencing full TSPyV genomes using sanger or NGS. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2016Dec 8;58:92. doi: 10.1590/S1678-9946201658092

Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo
2016;58:92
<http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201658092>

LETTER TO THE EDITOR

ALTERNATIVE METHODS FOR SEQUENCING FULL TSPyV GENOMES USING SANGER OR NGS

Sao Paulo, 22 July, 2016

Dear Editor

The trichodysplasia-spinulosa polyomavirus-associated (TSPyV) was first described in a solid organ transplant recipient with a rare skin disease¹. Initially mistaken as a side effect of cyclosporine treatment², the disease trichodysplasia-spinulosa (TS) is characterized by the development of keratin spines (spicules), follicular papules, hair follicle dilation and keratotic plugging of the infundibulum, which usually manifests on the face of the patient^{3,4,5}.

Occasionally, the lack of eyelashes and hair shafts can occur^{6,7,8}. Despite the strong association between TS and TSPyV, the mechanisms of pathogenesis and virus transmission are still unknown^{7,9}. Seroepidemiological data report that TSPyV is ubiquitous and the latent form of infection is present in more than 70% of the healthy population. In general, the prevalence ranges around 5% in children and can reach 70% in the adult population^{4,10}.

The first complete TSPyV genome was obtained in 2010 through Sanger sequencing¹. Later, Siebrasse *et al.*¹¹, used a set of four primer pairs to amplify and to sequence the complete viral genome, but the authors did not mention which sequencing platform was used. Our group has recently sequenced the whole TSPyV genome from biopsy fragments of spicules using Next Generation Sequencing (NGS)¹². Lastly, Tsuzuki *et al.*¹³, have sequenced a complete TSPyV genome from cardiac tissues also using NGS method -Illumina platform.

A detailed analysis on 13 TSPyV genomes isolated in USA, Australia and a sequence of another study carried out in the Netherlands revealed a sufficient degree of genetic diversity allowing this virus to be divided into three distinct lineages (TS-I, II, III)¹⁴. Interestingly, all the three lineages include viruses sampled in US, suggesting no geographic clustering of TSPyV. Nevertheless, more comprehensive genetic characterization of this virus needs to be done since only 13 samples were used to classify TSPyV in lineages, and viruses isolated in Brazil¹², the Netherlands¹ and Japan¹⁴ were not included in this analysis.

Herein we present fast and cost effective methods to sequence the full-length genome of TSPyV. A set of 10 primer pairs, which amplify fragments from 530 to 850 nucleotides with overlaps between each other, and two overlapping primer pairs to perform long PCR assays that generate fragments of 3,497 and 2,024 nucleotides (Table 1 and Fig. 1) were designed using the Primer3 program¹⁵. Conserved regions to anchor the primer were chosen based on the consensus obtained by multiple alignment of TSPyV reference sequences available at GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Similarity analysis was done using the Blast tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) to assure that the primers do not bind to other polyomaviruses.

In order to evaluate the effectiveness of the assays, DNA samples were extracted from spicules of a positive TSPyV sample¹¹ using the QIAamp

Table 1
List of primers used to amplify all the TSPyV genome regions

Primer	Sequences Short PCR	Coordinates*	Fragment Size
TSV_PA1_F	TTCCAATTAACACAGGCTT	3,666	670
TSV_PA1_R	AGATATACCTCCCTATGGGC		
TSV_PA2_F	CCTGCATGGTGTCAAACAAG	4,269	625
TSV_PA2_R	ACCATCCAGATAAAGGAGGA		
TSV_PA3_F	CCTCAGCCTCTGGTAATA	2	544
TSV_PA3_R	CAGATAGGCCTTCAACTGTC		
TSV_PA4_F	AAATGGGAGGAGTAATCAGC	405	855
TSV_PA4_R	CCATACAATCCCAGTACCAG		
TSV_PA5_F	TGAGGCTGCCACAGATGAAT	1,149	641
TSV_PA5_R	ACCCACTGCAAACATATGGA		
TSV_PA6_F	GTTGGAAACTCTTGCTCTGC	4,811	620
TSV_PA6_R	TCCTCAGGATAACGGTCTTA		
TSV_PA7_F	CCCCTATTGATTGGTCCTC	3,194	534
TSV_PA7_R	TTAAGCTACTGGAGGAAAGC		
TSV_PA8_F	AATTGGACAGTACCAAAACCA	2,732	605
TSV_PA8_R	ATTCTTCAGTATATGGCGGG		
TSV_PA9_F	CACCTCCAGTTTTCGAATT	2,020	805
TSV_PA9_R	ATCTTGCTTCAGGTTAGTG		
TSV_PA10_F	CCCATGTTGAATGAGGACC	1,608	575
TSV_PA10_R	CCTAGGTAGGCCTCTGTATT		
Long PCR			
TSV_T1F	TGAGGCTGCCACAGATGAAT	1,144	3,497
TSV_T1R	AAGCAAATGCACCAGAAGAAG		
TSV_T2F	CCAAAGGGAATCCAAGCAAT	4,498	2,024
TSV_T2R	CCCAGTACCAGAGGCAACAT		

*Coordinates correspond to the position of the primer forward and are based on Genbank reference KM007161.

DNA Mini Kit (Qiagen®, Germany) according to the manufacturer's instructions. Different primer concentrations, ranging from 0.2 to 1 µM were tested in solutions containing 1X PCR Buffer, 200 µM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen®, Inc., EUA), and 10 µL of template, reaching a final volume of 50 µL.

Cycling conditions used in short PCRs were tested with an initial denaturation of 94 °C for 5 minutes followed by 40 cycles of 94 °C for 30 seconds, annealing temperatures ranging from 50 °C to 60 °C for 50 seconds and extension times of 72 °C for 1 minute. A final extension step of 72 °C for 7 minutes was added after the fortieth cycle. The optimal annealing temperature for all ten primers was 55 °C, and 0.5 µM was the best primer concentration (data not shown).

Cycling conditions for long PCRs were also set up with an initial denaturation of 94 °C for 5 minutes followed by 45 cycles of 94 °C

In both cases, the genome assemblies were obtained by means of CLC genomic workbench v6 (CLC Bio, Qiagen). In the case of sequences generated in Ion Torrent, reads were trimmed to remove short and low-quality reads. Reads obtained from Sanger were only trimmed to remove regions with low quality. Using the related TSPyV genome as reference (GenBank ID KM007161)¹¹, reads from Ion Torrent were assembled using map reads to reference tool. Sequences generated by the method of Sanger were assembled using regular tools available at CLC to assemble contigs and chromatograms. Complete genomes generated in this work are available at GenBank IDs KX249740 (Blood collected in April) and KX249741 (Blood collected in February) using NGS methodology; and KX249742 (Blood collected in April) and KX249743 (Urine collected in April) using the method of Sanger.

Ultimately, the choice of the platform and sequencing approach will depend on the application, including the size of the research project and the number of genes/genomes to be sequenced. Therefore, the methods described here will ease the sequencing of the complete genome of TSPyV from all three already described lineages and significantly improve our ability to investigate the genetic diversity of this polyomavirus.

Correspondence to: Paulo Roberto Urbano, Laboratório de Virologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 470, 05403-000 São Paulo, SP, Brasil. Tel.: +55 11 30617020 ext. 112, Fax.: +55 11 30618680. E-mails: purbano@usp.br; cmromano@usp.br; anacarolina.soares@usp.br

This paper was supported by FAPESP, project # 2012/15381-7 and CNPq #446851/2014-0. Paulo Urbano holds a CAPES scholarship and Ana Carolina Oliveira holds a FAPESP scholarship #2012/15469-1.

None.

The study was approved by the Ethics Committee of the *Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*# 0234/10.

1. 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. *PLoSPathog.* 2010;6:e1001024.
2. Izakovic J, Büchner SA, Düggelein M, Guggenheim R, Itin PH. Hair-like hyperkeratoses in patients with kidney transplants. A new cyclosporine side-effect. *Hautarzt.* 1995;46:841-6.

3. Haycox CL, Kim S, Fleckman P, Smith LT, Piepkorn M, Sundberg JP, et al. Trichodysplasia spinulosa: a newly described folliculocentric viral infection in an immunocompromised host. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 1999;4:268-71.
4. 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.
5. Van Ghelue M, Khan MT, Ehlers B, Moens U. Genome analysis of the new human polyomaviruses. *Rev Med Virol*. 2012;22:354-77.
6. Sadler GM, Halbert AR, Smith N, Rogers M. Trichodysplasia spinulosa associated with chemotherapy for acute lymphocytic leukaemia. *Australas J Dermatol*. 2007;48:110-4.
7. Lee JS, Frederiksen P, Kossard S. Progressive trichodysplasia spinulosa in a patient with chronic lymphocytic leukaemia in remission. *Australas J Dermatol*. 2008;49:57-60.
8. Schwieger-Briel A, Balma-Mena A, Ngan B, Dipchand A, Pope E. Trichodysplasia spinulosa: a rare complication in immunosuppressed patients. *Pediatr Dermatol*. 2010;27:509-13.
9. Tan BH, Busam KJ. Virus-associated trichodysplasia spinulosa. *Adv Anat Pathol*. 2011;18:450-3.
10. Fukumoto H, Li TC, Kataoka M, Hasegawa H, Wakita T, Saeki H, et al. Seroprevalence of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in Japan. *J Clin Virol*. 2015;65:76-82.
11. Siebrasse EA, Bauer I, Holtz LR, Le BM, Lassa-Claxton S, Canter C, et al. Human polyomaviruses in children undergoing transplantation, United States, 2008-2010. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:1676-9.
12. Urbano PR, Pannuti CS, Pierrotti LC, David-Neto E, Romano CM. Rapid detection of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in skin biopsy specimen. *Genome Announc*. 2014;2 pii:e00694-14.
13. Tsuzuki S, Fukumoto H, Mine S, Sato N, Mochizuki M, Hasegawa H, et al. Detection of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in a fatal case of myocarditis in a seven-month-old girl. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7:5308-12.
14. Kazem S, Lauber C, van der Meijden E, Kooijman S, Kravchenko AA, TrichSpin Network, et al. Limited variation during circulation of a polyomavirus in the human population involves the COCO-VA toggling site of Middle and Alternative T-antigen(s). *Virology*. 2015;487:129-40.
15. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*. 2000;132:365-86.
16. Urbano PR, Nali LH, Bicalho CS, Pierrotti LC, David-Neto E, Pannuti CS, et al. New findings about trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (TSPyV)-novel qPCR detects TSPyV-DNA in blood samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;84:123-4.

Received: 22 July 2016
Accepted: 26 October 2016

9.8 – Artigo: Urbano PR, Oliveira RR, Romano CM, Pannuti CS, Fink MC. 2016. Occurrence, genotypic characterization, and patterns of shedding of human polyomavirus JCPyV and BKPyV in urine samples of healthy individuals in São Paulo, Brazil. *J Med Virol.* 88;1:153-158. doi: 10.1002/jmv.24318.

Journal of Medical Virology 88:153–158 (2016)

Occurrence, Genotypic Characterization, and Patterns of Shedding of Human Polyomavirus JCPyV and BKPyV in Urine Samples of Healthy Individuals in São Paulo, Brazil

Paulo Roberto Palma Urbano,* Renato Reis Oliveira, Camila Malta Romano, Claudio Sergio Pannuti, and Maria Cristina Domingues da Silva Fink

Laboratory of Virology, São Paulo Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

The objective of this study was to evaluate the prevalence, genotypic characterization, and determination of the patterns of shedding of human polyomavirus JC (JCPyV) and BK (BKPyV) in consecutive urine samples collected from healthy adults. Urine samples collected monthly over a 6 month period were screened by polymerase chain reaction (PCR) with two sets of primers complementary to the VP1 protein region specific for the JCPyV or BKPyV genome. The viral load of JCPyV and BKPyV in positive samples was determined by quantitative real time PCR. Seventy-one healthy individuals (ages between 18 and 65) were included in the study. Polyomavirus DNA urinary shedding was identified in 44 (62%) of the 71 individuals evaluated: BKPyV only in 16 (22.5%); JCPyV only in 19 (26.7%); and both in 9 (12.7%). Among the 28 individuals shedding JCPyV, the shedding was nearly continuous in 13 (46.4%) and sporadic in 15 (53.6%), whereas all BKPyV shedding was sporadic. A total of 45 (19 BKPyV and 26 JCPyV) strains were identified. Of the BKPyV strains, individuals were observed that excreted all genotypes except genotype 3 and the JCPyV strains, excretion of 5 different genotypes. Evaluating the age of individuals who excrete JCPyV and BKPyV, mostly are young adults, with a slight increase with increasing age and observing the viral load can not draw any parallel between the increase or decrease of age or excreted genotype as there was a wide variation both in the excretion of BKPyV and JCPyV. The high occurrence of isolated or simultaneous urinary shedding of JCPyV and BKPyV in healthy individuals merits further study. *J. Med. Virol.* 88:153–158, 2016.

© 2015 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: JCPyV; BKPyV; genotype; urinary shedding

INTRODUCTION

The human polyomaviruses JC (JCPyV) and BK (BKPyV), belonging to the genus *Polyomavirus* within the family *Polyomaviridae*, are commonly found in humans. Seroprevalence studies have shown that 60–80% of healthy individuals have antibodies against JCPyV and BKPyV [Shah et al., 1973; Egli et al., 2009; Antonsson et al., 2010]. After primary infection, which usually occurs in childhood, the viruses can establish a persistent infection in the genitourinary tract and be excreted in urine. These viruses have been identified as the cause of or a cofactor in the development of diseases in immunocompromised individuals. Infection with JCPyV is associated with progressive multifocal leukoencephalopathy, a usually fatal disease of the central nervous system, and with other neurological diseases that often affect AIDS patients (granule cell neuronopathy, encephalopathy and meningitis) [Agostini et al., 1997]. Infection with BKPyV is closely associated with hemorrhagic cystitis in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation, with interstitial nephropathy in patients undergoing renal transplantation and, more recently, with some neurological complications in HIV-infected patients [Cabello

Grant sponsor: FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; Grant number: 2010/51671-4

*Correspondence to: Paulo Roberto Palma Urbano, Laboratório de Virologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, São Paulo 05403-000, Brazil.

E-mail: purbano@usp.br

Accepted 25 June 2015

DOI 10.1002/jmv.24318

Published online 21 July 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

et al., 2008; Hilton et al., 2008]. Infection with JCPyV or BKPyV can result in transient asymptomatic viral shedding in the urine, blood, and feces of healthy and immunocompromised individuals. Nevertheless, there have been few studies of the prevalence and patterns of such shedding in immunocompetent individuals.

The aim of this study was to evaluate the occurrence and patterns of urinary shedding of BKPyV and JCPyV and genotypes in healthy adults. Additional objectives were to genotype the strains isolated, to assess viral loads, and to determine whether such shedding is associated with age or gender.

MATERIALS AND METHODS

Study Subjects

Between June 2012 and November 2013, a total of 71 healthy adults, all residents of the city of São Paulo, Brazil, were enrolled in the study. The median age of the participants was 33 years (range: 21–65 years). Of the 71 individuals evaluated, 54 (76.1%) were female, 54 (76.1%) were White, eight (11.3%) were Black, and nine (12.7%) were Asian. None of the subjects were taking any drugs that might influence urinary excretion, and none of the women were pregnant during the study period. All participants gave written informed consent to participate in the study. The study was approved by the Research Ethics Committees of the São Paulo Institute of Tropical Medicine and the University of São Paulo School of Medicine *Hospital das Clínicas* (Protocol no. 0032/11).

Urine Samples

From each subject, one urine sample was collected every month for 6 months. Therefore, a total of 426 urine samples were obtained from the 71 subjects.

Sample Preparation

From 200 μ l urine samples, total DNA were extracted with columns (QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit; QIAGEN, Hilden, Germany), according to the manufacturer instructions. All DNA extractions were subjected to PCR for β -globin gene using primers and the protocol described by Gopalkrishna et al. [2000] and all samples were positive for this gene.

Detection of JCPyV and BKPyV DNA

For the detection and genotyping of JCPyV DNA in urine samples, a 215bp fragment from the gene encoding the major capsid protein VP1 was amplified by polymerase chain reaction (PCR), with the primers JLP-15 and JLP-16 [Agostini et al., 2001]. For BKPyV detection, the same VP1 region was amplified with the primers BKV1 and BKV2, which are specific for BKPyV, amplifying a fragment of approximately 350bp [Krumbholz et al., 2006]. The sets of primers used for VP1 PCR.

The presence of JCPyV or BKPyV was confirmed by real-time PCR assay using sets of primers complementary to the early region of the (AgT) gene of each virus, yielding an 80bp fragment. Quantitative PCR (qPCR) assay was also used in order to determine the viral loads of JCPyV and BKPyV (expressed as mean $\pm$ SD) in positive samples [Pal et al., 2006].

In both reactions, the probe was labeled with 6-carboxyfluorescein as the reporter at the 5' end and 6-carboxytetramethylrhodamine as the quencher at the 3' end. The reaction end was prepared with 12.5 μ l of 2 $\times$ TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0.5 ml (10 mm) of each primer, 0.5 μ l (5 μ M) of the probe, 6 μ l of diethyl pyrocarbonate-treated water, and 5 μ l of sample. The reaction parameters were 2 min at 50°C and 10 min at 95°C, followed by 45 cycles of 15 s at 95°C, and 60 s at 60°C, in a thermal cycling system (ABI 7300; Applied Biosystems). The analytical sensitivity of these tests was 500 copies/ml for JCV and 600 copies/ml for BKV.

The analytical sensitivity of the test was obtained by serial dilutions of a PUC57 plasmid (GenScript, Inc., Piscataway, NJ) with insert of 360bp corresponding to the large T antigen fragments and VP1 of JCPyV and BKPyV in decaplicate (Probit analysis). The intra-assay reproducibility was evaluated using the 3 dilutions of the plasmid (1.00 $\pm$ e2; 1.00 $\pm$ e1; 1.00 $\pm$ e) in decaplicate and the deviation obtained was near to zero. The inter-assay reproducibility was confirmed by use of the same dilution of the plasmid in all reactions. The same operator performed all the reactions.

Sequencing of PCR Products

The PCR products were purified with a purification kit (QIAquick; QIAGEN), according to the manufacturer instructions, and were sequenced directly with the same primer pairs used in the amplification reaction (JLP-15/JLP-16 for JCPyV and BKV1/BKV2 for BKPyV). For the reaction, the purified products were added to a mixture containing 4 μ l of 2.5 $\times$ Ready Reaction Premix and 2 μ l of BigDye Sequencing buffer (Applied Biosystems), together with 3.2 pmol of each oligonucleotide and water, to a final volume of 20 μ l per sample. After the sequencing reaction, terminators were removed by a wash with 75% isopropanol, followed by another wash with 75% ethanol. The purified products were resuspended in 10% formamide and subjected to sequencing. This method of sequencing, using dideoxynucleotides labeled with different fluorescent substances for each (ddA, ddC, ddT, and ddG), allowed the simultaneous reading of the sensor in a single automated sequencing machine (ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

The sequences were aligned and analyzed with the software BioEdit, version 7.0.1 (Ibis Biosciences an Abbott Company Carlsbad, CA) [Hall, 1999].

Genotypes were determined by comparison with the reference sequences of all known genotypes [Agostini et al., 1996,1997; Jobes et al., 1998] and confirmed by phylogenetic analysis. The VP1 region sequences obtained in this study and reference sequences from GenBank were aligned by the MEGA software, version 5.0 (Tokyo Metropolitan University, Tokyo, Japan) [Tamura et al., 2011], and a maximum likelihood tree was created with PhyML software, version 3.0 (Universite de Montpellier, France) [Guindon and Gascuel, 2003], using the previously defined best-fit HKY85 model of evolution. The bootstrap test, with 1,000 replicates, was applied in order to assign degrees of confidence to the branching patterns of the maximum likelihood tree.

Statistical Analysis

The data were analyzed by Pearson's χ^2 test, followed by Fisher's exact test. Values of $P < 0.05$ were considered significant. All variables were evaluated using the SPSS Statistics Base, version 19 (IBM, Armonk, NY).

RESULTS

Occurrence Study

The overall occurrence of urinary shedding of polyomaviruses was 62% (44/71), with some overlapping of BKPyV and JCPyV shedding, which occurred in 35.2% (25/71) and 39.4% (28/71), respectively. Among the 71 individuals samples, BKPyV DNA was only detected in 16 (22.5%), JCPyV DNA was only detected in 19 (26.7%); and both were detected in 9 (12.7%). There was no gender difference between JCPyV and BKPyV shedding ($P = 0.26$, Table I).

To determine whether there was an association between urinary polyomavirus shedding and age, the subjects were stratified by age: ≤ 30 years ($n = 39$), 31–50 years ($n = 22$), and ≥ 51 years ($n = 10$). The occurrence of JVPyV shedding by age group was 36% (14/39), 36% (07/22), and 70% (07/10), respectively, with no significant difference among the groups ($P > 0.48$). However, the occurrence of JCPyV shedding was significantly higher in the oldest group (> 51) than in the youngest group. Regarding BKPyV shedding, there was no difference between groups

($P > 0.05$). It is noteworthy that no BKPyV shedding was detected in the ≥ 51 year age group.

Viral Loads in Positive Urine Samples

All samples that were PCR-positive for BKPyV or JCPyV were confirmed as such by qPCR assay. As shown in Figure 1, the mean viral load for JCPyV was $1.7e + 07 \pm 3.5e + 07$ copies/ml (range, $2.50e + 03$ to $1.19e + 08$ copies/ml; median, $3.44e + 05$ copies/ml). The mean viral load for BKPyV was $5.65e + 06 \pm 2.33e + 07$ copies/ml (range, $5e + 0$ to $1.24e + 08$ copies/ml; median, 1,153 copies/ml). There was no association between viral load and age and between viral load and genotype (data not shown).

Patterns of Urinary Polyomavirus Sheddings

The shedding patterns were defined on the basis of the number of samples testing positive during the study period, according to Polo et al. [2004]: sporadic (1–2 positive samples), short term (3–4 positive samples), and continuous (5–6 positive samples); 46.4% of the individuals testing positive for JCPyV shed the virus almost continuously, whereas 17.9% were short-term shedders and 35.7% were occasional shedders. Otherwise, all of the BKPyV shedders were classified as occasional shedders.

Fig. 1. Mean viral loads for JCPyV and BKPyV in healthy individuals.

TABLE I. Occurrence of Urinary Shedding of Polyomaviruses, by Gender

	Women	Men	Total
HPyV	(n = 54)	(n = 17)	(n = 71)
JCPyV, n (%)	11 (20.4)	8 (47.1)	19 (26.8)
BKPyV, n (%)	12 (22.2)	4 (23.5)	16 (22.5)
JCPyV + BKPyV, n (%)	7 (13.0)	2 (11.8)	9 (12.7)
None, n (%)	23 (42.6)	4 (23.5)	27 (38.1)

HPyV, human polyomavirus; JCPyV, polyomavirus JC; BKPyV, polyomavirus BK.

offspring, as well as parents (3 cases) or mothers (3 cases) of the six families suggesting that JCV transmission occurs both maternally and paternally [Zhong et al., 2004].

The possible presence of two different genotypes in an individual over study was discarded by sequencing of two different samples.

In this study, 39.4% of subjects testing positive for BKPyV at least a sample of urine. This rate is much higher than that observed in other studies reported that the rate of BKPyV urinary shedding varied from 1% to 16% [Polo et al., 2004; Rodrigues et al., 2007]. This high rate of BKPyV urinary shedding could have implications for the incidence of BKPyV and MCPyV infection and disease in kidney transplant recipients and other immunocompromised patients in this population [Signorini et al., 2014]. Unlike JCPyV, no association was found between urinary BKPyV spill and age. This is in line with a previous study, in which no differences were found for age-related urinary shedding BKPyV [Rodrigues et al., 2007]. The BKPyV shedding pattern was classified as sporadic in all individuals evaluated in this study. Previous studies in which the sequential samples were tested over a long monitoring period came to the same conclusion as to the pattern of shedding BKPyV blink [Vanchiere et al., 2005].

The BKPyV most prevalent genotype in this study was HCV genotype 1 which was detected in 80% of subjects. This result was predictable because the genotype 1 is the most prevalent genotype in the world BKPyV [Zheng, 2007; Krumbholz, 2008; Luo, 2008]. The second most common genotype in this study was BKPyV genotype 4, which has also been described in Asia and Europe. Among the strains classified as genotype 1 subtype 1a, the most prevalent subtype BKPyV in the world, responsible for everything in BKPyV-positive samples.

In this study, the occurrence of isolated or simultaneous urinary excretion JCPyV BKPyV and healthy individuals was high. The shedders JCPyV exhibited two shedding patterns (continuous or sporadic), whereas most showed sporadic BKPyV shedders pattern.

From an epidemiological point of view, it is important to know the occurrence of the virus in the environment and there is association between circulating genotypes with the diseases.

REFERENCES

- Agostini HT, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. 1996. Genotype profile of human polyomavirus JC excreted in urine of immunocompetent individuals. *J Clin Microbiol* 34:159–164.
- Agostini HT, Yanagihara R, Davis V, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. 1997. Asian genotypes of JC virus in Native Americans and in a Pacific Island population: Markers of viral evolution and human migration. *Proc Natl Acad Sci* 94:14542–14546.
- Agostini HT, Duckhut A, Jobs DV, Girones R, Schlunck G, Prost MG, Frias C, Pérez-Trallero E, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. 2001. Genotypes of JC virus in east, central and southwest Europe. *J Gen Virol* 82:1221–1231.
- Antonsson A, Green AC, Mallitt K, O'Rourke P, Pawlita M, Waterboer T, Neale RE. 2010. Prevalence and stability of antibodies to the BK and JC polyomaviruses—A long-term longitudinal study of Australians. *JGV Papers. J Gen. Virol.* 91: 1849–1853.
- Cabello V, Margarit N, Díaz Pedrero M, Bernal G, Pereira P, Gentil MA. 2008. Treatment of BK virus-associated nephropathy with Cidofovir in renal transplantation. *Trans Proc* 40:2930–2932.
- Coleman DV, Wolfendale MR, Daniel RA, Dhanjal NK, Gardner SD, Gibson PE, Field AM. 1980. A prospective study of human polyomavirus infection in pregnancy. *J Infect Dis* 142:1–8.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9:772.
- Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, Gosert R, Hirsch Y. 2009. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replications in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis* 199:837–846.
- Fumian TM, Guimarães FR, Pereira Vaz da Silva BJMT, Muylaert FF, Bofill-Mas S, Girones R, Leite JP, Miagostovich MP. 2010. Molecular detection, quantification and characterization of human polyomavirus JC from waste water in Rio De Janeiro, Brazil. *J Water Health* 8:438–445.
- Gopalkrishna V, Aggarwal N, Malhotra VL, Koranne RV, Mohan VP, Mittal A, Das BC. 2000. Chlamydia trachomatis and human papillomavirus infection in Indian women with sexually transmitted diseases and cervical precancerous and cancerous lesions. *Clin Microbiol Infect* 6:88–93.
- Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52:696–704.
- Hall TA. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid Symp Ser* 41:95–98.
- Hilton R, Tong C. 2008. Antiviral therapy for polyomavirus-associated nephropathy after renal transplantation. *J Antimicrob Chemother* 62:855–859.
- Husseiny MI, Anastasi B, Singer J, Lacey SF. 2010. A comparative study of Merkel cell, BK and JC polyomavirus infections in renal transplant recipients and healthy subjects. *J Clin Virol* 49: 137–140.
- IBM Corp. 2010. IBM SPSS statistics for Windows, version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- Jobs DV, Chima SC, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. 1998. Phylogenetic analysis of 22 complete genomes of the human polyomavirus JC virus. *J Gen Virol* 79:2491–2498.
- Kitamura T, Kinutake T, Guo J, Tominaga T, Kawabe K, Yogo Y. 1994. Transmission of the human polyomavirus JC virus occurs both within the family and outside the family. *J Clin Microbiol* 32:2359–2363.
- Krumbholz A, Zell R, Egerer R, Sauerbrei A, Helming A, Gruhn B, Wutzler P. 2006. Prevalence of BK virus subtype I in Germany. *J Medical Virol* 78:1588–1598.
- Kunitake T, Kitamura T, Guo J, Taguchi F, Kawabe K, Yogo Y. 1995. Parent-to-child transmission is relatively common in the spread of the human polyomavirus JC virus. *J Clin Microbiol* 33:1448–1451.
- Luo C, Bueno M, Kant J, Randhawa P. 2008. Biologic diversity of polyomavirus BK genomic sequences: Implications for molecular diagnostic laboratories. *J Med Virol* 80:1850–1857.
- Matos A, Duque V, Beato S, da Silva JP, Major E, Melico-Silvestre A. 2010. Characterization of JC human polyomavirus infection in a Portuguese population. *J Med Virol* 82:494–504.
- Nali LH, Centrone Cde, Penalva-de-Oliveira PR, Vidal AC, Miranda JE, Pannuti EP, Fink CS. 2012. High prevalence of the simultaneous excretion of polyomaviruses JC and BK in the urine of HIV-infected patients without neurological symptoms in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 54:201–205.
- Pal A, Sirota L, Maudru T, Peden K, Lewis A, Jr. 2006. Real-time, quantitative PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. *J Virol Methods* 135:32–42.
- Polo C, Pérez JL, Mielnichuck A, Fedele CG, Niubò J, Tenorio A. 2004. Prevalence and patterns of polyomavirus urinary excretion in immunocompetent adults and children. *Clin Microbiol Infect* 10:640–644.

TABLE II. Proportion of BKPyV Subtypes and Genotypes in Urine Samples From Healthy Individuals

BKPyV genotype	Positive individuals
1	16 (80%)
2	1 (5%)
3	—
4	2 (10%)
Without identification	1 (5%)

For each of the subjects testing positive for polyomavirus, two positive samples was purified and subjected to a sequencing reaction to determine JCPyV and BKPyV genotypes through phylogenetic analysis. In individuals who had continuous excretion, two samples with the highest viral load were sequenced. Among the BKPyV strains obtained in the study, it was found that individuals excreted all genotypes except genotype 3 as shown in Table II, which from literature data, this is rarely excreted, and generally excreted by pregnant women [Coleman et al., 1980] and one of the excretory subjects had double excretion in the same unique sample. Among the individuals who excrete the JC polyomavirus, we found five different genotypes, and among the excretory genotype 1, we found the two subtypes as shown in Table III.

For the BKPyV and JCPyV VP1 analysis, unalignable regions were removed, and the remainder of the alignment was concatenated. Maximum likelihood trees were generated using PhyML, version 3.0, with 1,000 bootstrap replicates and the best model as determined by JModelTest software, version 2.1.7 [Posada, 2008; Darriba et al., 2012].

DISCUSSION

The high urinary shedding rates and BKPyV JCPyV found between healthy individuals in the present study (35.2% and 39.4%, respectively) were comparable to those reported in other studies, in which the urinary excretion rates ranged JCPyV from 20.7% to 48% [Schaffer et al., 2006; Rossi et al., 2007; Matos et al., 2010]. The finding that 70% of

individuals aged ≥ 51 years exhibited JCPyV spill is supported by other studies showed an increase in the rate of shedding JCPyV in older individuals, especially those over 50 years of age [Schaffer et al., 2006; Rodrigues et al., 2007]. An unexpected result, however, was the high rate of co-infection in this population, 11 of the 71 individuals being found to launch both polyomaviruses. In another study conducted in Brazil, Nali et al. [2012] also reported (56%) much greater rate and simultaneous pouring JCPyV BKPyV, although the study population was composed exclusively of individuals with AIDS.

Viral loads and to JCPyV BKPyV were substantially greater in this study than in an earlier report by Husseiny et al. [2010] found that very low mean viral loads in healthy individuals (3×10^2 copies/ml and 80 copies/ml for JCPyV and BKPyV, respectively). The use, in this study, of sequential urine samples may explain the high-viral loads at different times. It is assumed that these variations are caused by physiological changes, as the same controls were used in all reactions, and the results were reproducible.

To our knowledge, no studies comparing immunocompromised and immunocompetent individuals in terms of viral load JCPyV and BKPyV in urine samples. However, the finding that some of the healthy subjects in the present study had urinary viral loads JCPyV or BKPyV comparable to those observed in immunocompromised patients must be interpreted with caution.

The JCPyV genotypes most frequently found in this study were genotype 1b and genotype 3 (34.7% each). These two genotypes are commonly found in the southeastern European countries (genotype 1b) and Africa (genotype 3). Genotype 3, described in populations of West Africa, may have been introduced via Angola slave trade to Brazil, especially in the late 16th century. In contrast, the high occurrence of genotype 1b in this population might be explained by the large number of Brazilians who are descendants of immigrants from Southeast Europe (Portugal, Spain, or Italy), where this species is highly prevalent. Genotype 1a, originating from northern Europe (Germany and Hungary), and genotype 4 were also found, although at lower rates (8.7% for both). The two individuals of Asian origin in this study shed JCPyV genotype 3. This finding was unexpected, as several studies have reported that genotypes 2 and 7 are the most common genotypes JCPyV in Asian populations. As the transmission occurs JCPyV horizontally into and out of the family [Kitamura et al., 1994], genotype 3 infection was probably through external sources. Fumian et al. [2010] JCPyV detected in 43% of treated sewage samples in the city of Rio de Janeiro, and the genotype most frequently encountered by these authors was genotype 3. On the other hand, only parents of these two individuals are of Asian origin, while mothers are not. Therefore, the mothers of these people could be the source genotype 3. This is evidenced by Kunitake et al. [1995] detected the same sequences in the

TABLE III. Proportion of JCPyV Subtypes and Genotypes in Urine Samples From Healthy Individuals

JCPyV genotype/subtypes	Positive individuals
1-1a	2 (8.7%)
1-1b	8 (34.7%)
2	1 (4.4%)
3	8 (34.7%)
4	2 (8.7%)
5	—
6	1 (4.4%)
7	—
8	—
Without identification	1 (4.4%)

- Posada D. 2008. JModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25:1253–1256.
- Rodrigues C, Pinto D, Medeiros R. 2007. Molecular epidemiology characterization of the urinary shedding of polyomavirus in healthy individuals from Portugal—A southern European population. *J Med Virol* 78:1194–1198.
- Rossi A, Delbue S, Mazziotti R, Valli M, Borghi E, Mancuso R, Calvo MG, Ferrante P. 2007. Presence, quantitation and characterization of JC virus in the urine of Italian immunocompetent subjects. *J Med Virol* 79:408–412.
- Shah KV, Daniel RW, Warszawski RM. 1973. High prevalence of antibodies of BK virus, on SV 40 related papovavirus, in residents of Maryland. *J Infect Dis* 127:784–787.
- Signorini L, Belingheri M, Ambrogi F, Pagani E, Binda S, Ticozzi R, Ferrareso M, Ghio L, Giacon B, Ferrantea P, Delbue S. 2014. High frequency of Merkel cell polyomavirus DNA in the urine of kidney transplant recipients and healthy controls. *J Clin Virol* 61:565–570.
- Schaffer K, Sheehy N, Coughlan S, Bergin C, Hall Y. 2006. JC virus in the Irish population: Significant increase of genotype 2 in immunocompromised individuals. *J Neurovirol* 12:39–46.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA A5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony. *Mol Biol Evol* 28: 2731–2739, doi 10.1093/molbev/msr 121.
- Vanchiere JA, Nicome RK, Greer JM, Demmler GJ, Butel JS. 2005. Frequent detection of polyomaviruses in stool samples from hospitalized children. *J Infect Dis* 192:658–664.
- Zheng Y-Y, Nishimoto Y, Chen Q, Hasegawa M, Zhong S, Ikegaya Y, Ohno N, Sugimoto C, Takasaka T, Kitamura T, Yogo Y. 2007. Relationships between BK virus lineages and human populations. *Microbes Infect* 9:204–213.
- Zheng HY, Kitamura T, Takasaka T, Chen Q, Yogo Y. 2004. Unambiguous identification of JC polyomavirus strains transmitted from parents to children. *Arch Virol* 149:261–273.

9.9 – Artigo: Urbano PR, Nali LH, Bicalho CS, Pierrotti LC, David-Neto E, Pannuti CS, Romano CM. 2016. New findings about trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (TSPyV) - novel qPCR detects TSPyV-DNA in blood samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 84;2:123-124. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.011.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 84 (2016) 123–124

Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobio

New findings about trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (TSPyV)—novel qPCR detects TSPyV-DNA in blood samples

Paulo R. Urbano ^a, Luiz H.S. Nali ^a, Camila S. Bicalho ^b, Lígia C. Pierrotti ^b, Elias David-Neto ^b, Cláudio S. Pannuti ^a, Camila M. Romano ^{a,*}

^a São Paulo Institute of Tropical Medicine, São Paulo, Brazil

^b University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 July 2015

Received in revised form 15 September 2015

Accepted 15 October 2015

Available online 21 October 2015

Keywords:

Blood
Polyomavirus
Real-time PCR
Immunocompromised patient
TSPyV

ABSTRACT

A new real-time PCR assay for trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (TSPyV) DNA detection was designed, and blood samples from kidney transplant recipients and healthy individuals were screened. TSPyV-DNA was not detected in blood from healthy individuals, but 26.8% of kidney recipients presented TSPyV-DNA. This is the first report of TSPyV viremia.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (TSPyV) was first isolated in 2010 from an immunocompromised patient with trichodysplasia spinulosa (TS) (Tan and Busam, 2011; van der Meijden et al., 2010).

TS is a rare disease first reported in 1995 (Izakovic et al., 1995), associated with uncontrolled proliferation of inner root sheath cells and with the development of follicular papules and keratin spines, also known as spicules (Schwieger-Briel et al., 2010; Tan and Busam, 2011; van der Meijden et al., 2010). So far, all reported cases have been exclusively observed in immunocompromised patients, mostly kidney transplant (KT) recipients, presenting identical clinical manifestations: spiny follicular papules and spines distributed on the face (Schwieger-Briel et al., 2010; Tan and Busam, 2011).

TSPyV genome has around 5230 bp containing 5 open reading frames divided into early, late, and noncoding control region and, differently from polyomavirus JC Polyomavirus and BK Polyomavirus, has no agnoprotein (van der Meijden et al., 2010).

According to seroepidemiological data, TSPyV is ubiquitous and latently infects 70% of healthy adults (Chen et al., 2011; Fukumoto et al., 2015). TSPyV-DNA has been detected in high prevalence only in TS skin lesions, and the abundant expression of TSPyV proteins in the affected hair follicle cells indicates the involvement of the virus in the TS pathogenesis (Kazem et al., 2013). To our knowledge, TSPyV has been only successfully detected in other than skin-derived materials as

urine, kidney samples, stool, and nasopharyngeal swabs and researchers have failed to detect TSPyV in blood and cerebrospinal fluid (Kazem et al., 2013; Rockett et al., 2013).

To date, there is no gold standard test to detect TSPyV. Usually, conventional PCR for TSPyV and histopathologic findings in biopsy are used to confirm viral presence (Elaba et al., 2012; Fava et al., 2015). The availability of a specific and sensitive molecular test that detect viral DNA in biological samples in low amounts is crucial to confirm the diagnosis in TS suspected cases and to contribute to the understanding of the virus pathogenesis and potential reservoirs. Herein, we describe a real-time PCR (qPCR) to detect and quantify TSPyV in biological samples.

In order to determine TSPyV prevalence in healthy and immunocompromised individuals, we investigated blood samples from KT recipients ($n = 71$) and from healthy individuals ($n = 71$). Blood samples from KT recipients were randomly selected from patients enrolled in a study designed to monitor BK virus and other polyomaviruses. This study was approved by the Ethics Committee of the Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (# 0234/10).

A qPCR directed to the region between the large and small T Ag was developed. Primers and probe were selected based on a multiple alignment of publically available TSPyV sequences (GenBank), which also included the virus we previously described from an immunocompromised renal recipient that developed TS (Urbano et al., 2014) (Table 1). DNA was obtained from 200 μ L of total blood using QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), and 5 μ L was used as template for the qPCR assay containing also 12.5 μ L of 2 $\times$ TaqMan Universal PCR Master Mix

* Corresponding author. Tel.: +55-11-3061-7020x112; fax: +55-11-3061-8680.
E-mail address: cmromano@usp.br (C.M. Romano).

Table 1
Primers and probe used in qPCR and conventional PCR.

Primer	Sequence	Coordinates ^a	Size
TSPyVa_F	TGGTGGATTTCATGGCAGAAGAG	4239	83
TSPyVa_R	GCTGGTGGGAAAGCTTCAATC	4322	
Probe	FAM TCTGGGTCTGCTGGTGTCAA BHQ-1	4262	
TSPyV_Fconv ^b	TTCCAATTAACACAGGCTT	3668	
TSPyV_Rconv ^b	AGATATACCTCCCTATGGGC	4357	

^a Coordinates based on KM007161 reference sequence (GenBank).

^b Primers for conventional PCR.

(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 10 mmol/L of each primer and probe, and 4.5 µL of ultrapure water (final volume = 25 µL). Furthermore, 1 U of Taq Platinum DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was added to improve the yield of qPCR. The optimal temperature for primers and probe annealing was 58 °C. Samples were tested in duplicates, and a plasmid containing only the region of interest was commercially acquired (GenScript CO) and used as positive control. The sensitivity of the test was determined through standard curve, and the limit of detection was 500 copies/mL. To determine the specificity of qPCR, urine samples known to be positive for other polyomavirus were tested. All of them were negative for TSPyV. Details of experimental design as reproducibility, specificity, and intertests are available upon request.

After the standardization, blood samples from KT recipients and healthy individuals were investigated for TSPyV-DNA. To avoid false-positive results, rigorous procedures used for nucleic acid extraction and amplification techniques were followed.

The median age of KT recipients and healthy individuals was 32 years (22–71) and 33 years (21–65). The overall prevalence of TSPyV-DNA in blood among KT recipients was 26.8% (19/71), and the mean viral load was $1e + 05$ copies/mL (800 to $1.19e + 06$ copies/mL). To exclude the possibility that positive samples were due to accidental plasmid contamination during the qPCR, a conventional PCR using primers directed to the beginning of the AgT region (not included in the plasmid construction, Table 1) was done on positive samples chosen at random. All samples tested were confirmed to be positive for TSPyV-DNA (data not shown). TSPyV was not detected in healthy individuals.

TSPyV-DNA has been reported in fluids and tissues of both healthy immunocompetent and TS patients. Nevertheless, TSPyV-DNA was never found in blood, even from patients with advanced disease or immunocompromised individuals (Chen et al., 2011; Fukumoto et al., 2015; Kazem et al., 2013; Rockett et al., 2013; van der Meijden et al., 2010). In this study, we present for the first time TSPyV viremia in immunosuppressed KT patients not experiencing TS. The test described here may represent a gain in TSPyV detection in blood and virtually, in other biological samples, although the validation in other samples is still needed.

In sum, we presented here a sensitive method to detect and quantify TSPyV in blood. We also pointed out the unexpected high rate of TSPyV viremia among immunocompromised individuals. Although it may represent a progress to the TS diagnosis, further studies are necessary to determine the prevalence of TSPyV in the general and susceptible population. In addition, the relation between immunosuppression, viral reactivation, and development of TS is not clear so far. Although TS disease occurs only in severely immunocompromised patients, the high rate of viremia among non-TS kidney recipients is suggestive of subclinical, possibly latent infection. To determine whether immunosuppression is related to viral reactivation in blood and development of the disease, as well as occur with other polyomaviruses, additional studies are needed.

Funding

This paper was supported by FAPESP, project # 2012/15381-7 and CNPq #446851/2014-0. Paulo Urbano holds a CAPES scholarship.

References

- 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.
- Elaba Z, Hughey L, Isayeva T, Weeks B, Solovan C, Solovastru L, et al. Ultrastructural and molecular confirmation of the trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in biopsies of patients with trichodysplasia spinulosa. *J Cutan Pathol* 2012;39(11):1004–9.
- Fava P, Merlino C, Novelli M, Ponti R, Galliano I, Montanari P, et al. HPyV6, HPyV7 and TSPyV DNA sequences detection in skin disease patients and healthy subjects. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 2015. <http://dx.doi.org/10.1111/jdv.13094>.
- Fukumoto H, Li TC, Kataoka M, Hasegawa H, Wakita T, Saeki H, et al. Seroprevalence of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in Japan. *J Clin Virol* 2015;65:76–82.
- Izakovic J, Buchner SA, Duggelin M, Guggenheim R, Itin PH. Hair-like hyperkeratoses in patients with kidney transplants. A new cyclosporin side-effect. *Hautarzt* 1995;46:841–6.
- Kazem S, van der Meijden E, Feltkamp MC. The trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus: virological background and clinical implications. *APMIS* 2013;121(8):770–82.
- Rockett RJ, Sloots TP, Bowes S, O'Neill N, Ye S, Robson J, et al. Detection of novel polyomaviruses, TSPyV, HPyV6, HPyV7, HPyV9 and MWPyV in feces, urine, blood, respiratory swabs and cerebrospinal fluid. *PLoS ONE* 2013;8(5):e62764.
- Schwieger-Briel A, Balma-Mena A, Ngan B, Dipchand A, Pope E. Trichodysplasia spinulosa—a rare complication in immunosuppressed patients. *Pediatr Dermatol* 2010;27(5):509–13.
- Tan BH, Busam KJ. Virus-associated trichodysplasia spinulosa. *Adv Anat Pathol* 2011;18:450–3.
- Urbano PRP, Pannuti CS, Pierrotti LC, David-Neto E, Romano CM. Rapid detection of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in skin biopsy specimen. *Genome Announce* 2014;2(4):e00694–14.
- van der Meijden E, Janssens RW, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalya AE, Feltkamp MC. Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromised patient. *PLoS Pathog* 2010;6:e1001024.

9.10 – Artigo: First phylogenetic analysis of dengue virus serotype 4 circulating in Espírito Santo state, Brazil, in 2013 and 2014. Vicente CR, Pannuti CS, Urbano PR, Felix AC, Cerutti Junior C, Herbingher KH, Fröschl G, Romano CM. Epidemiol Infect. 2018 Jan;146(1):100-106. doi: 10.1017/S0950268817002618.

Epidemiol. Infect. (2018), **146**, 100–106. © Cambridge University Press 2017
doi:10.1017/S0950268817002618

First phylogenetic analysis of dengue virus serotype 4 circulating in Espírito Santo state, Brazil, in 2013 and 2014

C. R. VICENTE^{1,2*}, C. S. PANNUTI³, P. R. URBANO³, A. C. FELIX³,
C. CERUTTI JUNIOR², K.-H. HERBINGER⁴, G. FRÖSCHL^{1,4}
AND C. M. ROMANO³

¹ Centre for International Health, Medical Centre of the University of Munich, Munich, Germany

² Department of Social Medicine, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil

³ Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁴ Division of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Medical Centre of the University of Munich, Munich, Germany

Received 9 August 2017; Final revision 13 October 2017; Accepted 31 October 2017;
first published online 27 November 2017

SUMMARY

The purpose of the present study was to reconstruct the phylogeny of dengue virus serotype 4 (DENV-4) that was circulating in Espírito Santo state, Brazil, in 2013 and 2014, and to discuss the epidemiological implications associated with this evolutionary hypothesis. Partial envelope gene of eight DENV-4 samples from Espírito Santo state were sequenced and aligned with 72 worldwide DENV-4 reference sequences from GenBank. A phylogenetic tree was reconstructed through Bayesian Inference and the Time of the Most Recent Common Ancestor was estimated. The study detected the circulation of DENV-4 genotype II in Espírito Santo state, which was closely related to strains from the states of Mato Grosso collected in 2012 and of São Paulo sampled in 2015. This cluster emerged around 2011, approximately 4 years after the entry of the genotype II in Brazil through its northern states, possibly imported from Venezuela and Colombia. This is so far the first phylogenetic study of the DENV-4 circulating in Espírito Santo state and shows the importance of an internal route of dengue viral circulation in Brazil to the introduction of the virus into this state.

Key words: Brazil, dengue virus, epidemic, genotype, phylogeny.

INTRODUCTION

Dengue fever is caused by a virus that belongs to the *Flavivirus* genus and is endemic in tropical and sub-tropical areas. A study applying cartographic methods estimated an annual occurrence of 390 million dengue viral infections globally [1]. This estimation is more

than three times higher than the numbers pointed previously by the World Health Organization, which ranged from 50 to 100 million cases [1]. The study using cartographic methods also estimated 96 million symptomatic dengue fever cases per year in the world [1]. The dengue virus complex is composed by four serotypes. There are genetic variants within each serotype constituting phylogenetic clusters, denominated genotypes, which differ in geographical distribution [2], virulence and transmissibility [3]. The genome of this ribonucleic acid (RNA) virus has about 10 700 nucleotides, encoding three structural and seven

* Author for correspondence: C. R. Vicente, Centre for International Health, Medical Centre of the University of Munich and Department of Social Medicine, Federal University of Espírito Santo, Avenida Marechal Campos 1468, 29040-090, Vitória, Brazil.
(Email: vicentecrachel@gmail.com)

non-structural proteins [4] with considerable genetic variation. This variation is a consequence of mutations caused by RNA polymerase [5] and a result of natural recombination [6]. The adaptive potential of the virus favours the territorial expansion of the disease [7].

Dengue fever re-emerged in Brazil in the 1980s, when dengue virus serotype 1 and dengue virus serotype 4 (DENV-4) were detected in the country [8]. At that time, the circulation of DENV-4 was restricted to the northern states and remained detectable during only a few months. After more than 20 years without DENV-4 detection in the country, this serotype was observed again in 2010 in Roraima and subsequently spread to other locations in Brazil [9].

Dengue fever cases have been reported in Espírito Santo state since 1995. The first detection of DENV-4 occurred only in 2012 when the other three serotypes were already established in the state. According to the Health Department of Espírito Santo state, in the first 2 years after the detection of DENV-4, 107963 suspected dengue fever cases were reported in the state: 82 928 in 2013 and 25 035 in 2014 [10]. The epidemic in 2013 accounted for the highest number of dengue fever incident cases in the state history and amounted to 1595 hospitalisations [11], 74 cases of dengue haemorrhagic fever and 12 deaths [12].

Genetic characterisation [7] and phylogenetic reconstructions of viruses circulating in a given population help to elucidate the role of human movements in dengue viral spread [13] and contribute to understanding epidemic patterns of this disease [7]. This study presents the first phylogeny of DENV-4 circulating in Espírito Santo state, with samples collected during an unprecedented epidemic related to this serotype.

METHODS

Samples

Blood samples were collected from 56 patients with suspected dengue viral infection during the viraemic phase (up to 3 days after the onset of symptoms), who consulted the public health units located in Vitória, the capital of Espírito Santo state, Brazil, in 2013 and 2014. Whole blood (2.5 ml) was collected and stored at -80°C until the beginning of the extraction process.

Molecular analysis

The QIAamp RNA Blood Mini Kit™ produced by QIAGEN© was used for the extraction of the viral

RNA from the whole blood, following the instructions of the manufacturer. The High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit™ (Thermo Fisher Scientific©) was used to synthesise the complementary deoxyribonucleic acid, according to the manufacturer's instruction. Qualitative reverse-transcriptase-polymerase chain reaction (PCR) assay [14] was used to confirm dengue viral infection in the samples. Fourteen samples were positive for the presence of dengue virus RNA, but six of them presented a low viral load, which consequently impaired the successful amplification by conventional PCR. The primers used to amplify a fragment of the envelope gene of 1300 nucleotides (position 564–1864 of the DENV-4 genome – reference ID JN559741) were ENVD4_Fw – CACGTATAAATGCCCCCTACTGGTC and ENV D4_Rv – GCTGTGTTTCTGCCATCTCTTTGTC. The PCR was prepared to a final volume of 50 µl containing 10 µl of the template, 10× PCR buffer, 1.5 mM of MgCl_2 , 200 mM of dNTPs, 1 mM of each primer and 1 U of platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen©). Cycling condition for PCR was as follows: 45 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min. Seven minutes were taken for the final extension. Amplicons were purified through GFX purification kit (GE Healthcare©) according to the manufacturer instructions. They were sequenced directly by Sanger methodology, using the same primer pairs of the amplification reaction.

Phylogenetic and coalescent reconstruction

Reads were inspected for quality, trimmed and assembled by CLC genomic Workbench v.6 (<http://www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-genomics-workbench/>). Consensus sequences were aligned together with reference sequences retrieved from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) in the software Clustal X [15]. An initial dataset ($n = 93$) including sequences from Espírito Santo state ($n = 8$) and reference sequences from all four serotypes ($n = 85$) was used to confirm the serotype. A second dataset including samples from Espírito Santo state ($n = 8$) and reference sequences ($n = 70$) of different DENV-4 genotypes was created ($n = 78$) and used to reconstruct the phylogenetic tree. Sequences of DENV-4 circulating in São Paulo in 2015 ($n = 2$) were also included in order to highlight the genetic variability of strains recently circulating in Brazil. The GTR + I + G substitution model was found to be the best model for both datasets according to jModelTest [16]. Phylogenetic

estimates were made using the Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) framework implemented in BEAST v1.8.3 [17]. Convergence of parameters during the MCMC was inspected with Tracer v1.6 [17], with uncertainties addressed as 95% highest probability density intervals. Twenty million chains were sufficient to achieve convergence on all parameters (ESS.200). The trees were sampled at each 2000 steps, resulting in a final file of 10 000 trees, summarised in a maximum clade credibility tree using TreeAnnotator (part of the BEAST package), and visualised in FigTree v1.4.2 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/FigTree>). The least constrained Bayesian Skyline (BSL) coalescent prior was used to estimate the rate of nucleotide substitution and the Time to the Most Recent Common Ancestor (TMRCA). The BSL was performed under relaxed (exponential and uncorrelated lognormal) molecular clocks. The molecular clock that best fit the data was evaluated by Bayes factor (BF) comparison.

Compliance with ethical standards

The Research Ethics Committee of the Federal University of Espírito Santo (opinion number 881909) and the Research Ethics Committee of the University of Munich (opinion number 231-15) approved the research protocol. All participants signed an informed consent form.

RESULTS

Eight partial envelope gene samples were successfully amplified and sequenced. The reconstructed phylogenetic tree shows that isolates from Espírito Santo state belong to the genotype II [18]. DENV-4 viruses circulating in 2013 and 2014 were closely related to viruses isolated in 2012 in Mato Grosso state and in 2015 in São Paulo state, with a posterior probability value of 0.98 for this clade. According to the MCMC estimates, DENV-4 evolves at a rate of 1.1×10^{-3} , which was close to the previous estimates for this serotype [5]. Using this rate of nucleotide substitution estimated under the relaxed uncorrelated lognormal molecular clock (BF = 4.96), DENV-4 genotype II was introduced to the American continent between 1973 and 1981 (Fig. 1, node A). The strains circulating in Puerto Rico during that period generated a lineage that spread to the other Caribbean and South American countries. More than 20 years later, in the 2000s, at least two distinct introductions of DENV-4 genotype II occurred in Brazil. One was restricted to

Pará state between 2004 and 2010 (Fig. 1, node B), with possible Caribbean origin. The other introduction occurred between 2004 and 2008 (Fig. 1, node C) in the region of Amazonas state and Roraima state, with probable Venezuelan and Colombian origins. From Roraima state, the virus spread to other Brazilian states, reaching the locations described within the clade, such as Espírito Santo state, between 2010 and 2012 (Fig. 1, node D). Figure 2 presents a map illustrating the possible origins of the strains circulating in the Brazilian states included in the study.

The sequences obtained in this study were deposited in GenBank under the codes from KU745629 to KU745638.

DISCUSSION

The phylogenetic reconstruction based on a partial envelope gene sequence indicates the presence of the DENV-4 genotype II in Espírito Santo state in 2013 and 2014. The genotype II is the most prevalent DENV-4 genotype on the American continent [19], where it was introduced between the 1970s and the beginning of the 1980s [19–21]. Puerto Rico is the possible origin of strains that spread to South America in the 1980s, corroborating the inferences on this country as a source of DENV-4 population in waves of dispersion for the continent [21].

According to the present results, Brazil suffered at least two distinct introductions of DENV-4 genotype II in the 2000s, both in the northern region. One introduction, apparently restricted to Pará state, occurred between 2004 and 2010 by the direct importation of viruses from Puerto Rico, which remains an important route for dengue virus circulation between the Caribbean islands and South America. The second introduction was observed in the states of Amazonas and Roraima, with the probable importation of strains from Venezuela and Colombia, as anteriorly demonstrated [19]. This introduction occurred between 2004 and 2008, at least 2 years before the first official report of a new DENV-4 circulation in Brazil, which occurred in Roraima in 2010. Thereby, DENV-4 circulated undetected for years, probably due to a restricted circulation in populations where other serotypes were already established [22, 23]. This finding reinforces the importance of intensifying the viral surveillance in the Brazilian public health system, enabling the prediction of potential epidemics due to the circulation of a virus in an immunologically naive population. The present results also support the

Fig. 1. Maximum clade credibility tree of dengue virus serotype 4. The phylogenetic tree shows the genotypes I, II and III of dengue virus serotype 4 (DENV-4). Partial envelope gene sequences of DENV-4 (1300 nucleotides) from Espírito Santo

Fig. 2. Map showing the clades identified in the Brazilian states and possible routes for dengue introduction in South America and for dengue dispersion in Brazil. The abbreviations correspond to the name of the following Brazilian states: Espírito Santo (ES), São Paulo (SP), Mato Grosso (MT), Roraima (RR), Amazonas (AM), Pará (PA) and Bahia (BA).

relevance of an integrated epidemiological surveillance in the Americas, since the identification of a new dengue virus strain in bordering countries is a predictor for its future introduction in surrounding territories, including foreign areas. Therefore, the close relationship of northern Brazilian states with Venezuela and Colombia may have contributed to the entry of humans infected by the virus into Brazil.

The strains of DENV-4 genotype II introduced in Roraima state are likely to have spread broadly in the country, generating a more recent lineage that emerged in Brazil around 2011 [23]. The strains of Espírito Santo state are grouped into this lineage. They are closely related to viruses from other Brazilian states, such as Mato Grosso and São Paulo, which implies that the DENV-4 genotype II

state ($n=8$) and envelope gene sequences from GenBank were analysed. The phylogenetic tree shows the posterior probability values in the branches and the dates of the nodes (A, B, C and D), with lower and upper values within parenthesis. The length of the branches corresponds to sampling time. Sequence identifications include the GenBank code, the place and the year of the sample collection. The abbreviations in the sequence identifications correspond to the name of the following Brazilian states: Espírito Santo (ES), São Paulo (SP), Mato Grosso (MT), Roraima (RR), Amazonas (AM), Pará (PA) and Bahia (BA). The sequences from Espírito Santo state are marked with an asterisk.

found in Espírito Santo state was introduced from other Brazilian states, as similarly suggested previously for dengue virus serotype 2 [24]. Due to the absence of immunological protection against DENV-4 in the population of Espírito Santo state, the epidemic that followed the introduction and broad spread of this serotype, in 2013, accounted for the highest number of dengue fever cases reported to date in the state. These findings demonstrate a fast spread of dengue virus between Brazilian states, established by an internal route of intense viral circulation, which was able to reach distant territories, such as Espírito Santo state, located in the littoral of the southeast region, few years after the first report of DENV-4 in the northern area of Brazil. Espírito Santo state is located more than 3300 km far from Roraima, the first state to report DENV-4.

Despite the limited sample size, the present study was able to determine the relation of the DENV-4 circulating in Espírito Santo state with those from other regions for the first time. This information is relevant in order to understand the dynamic of viral circulation and to estimate how fast a new serotype can circulate, supporting the public health sector in the preparation to future viral introductions. The results also increase the knowledge about the most recent dengue virus serotype identified in the country, which in Espírito Santo state was the main agent involved in the most extensive epidemic recorded so far there.

The present study evidences the importance of considering the dynamic of dengue fever occurrence beyond local aspects. Since neighbouring countries and states are involved in the disease spread, the intensity of human movement across the territories might have facilitated the dispersion of the dengue virus among their populations. This factor must be considered in the public health evaluations about dengue fever.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge the Health Department of Vitória municipality, for the logistic support in the collection of samples. This work was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) (C.R.V., grant number 9589-13-9); the São Paulo State Foundation (FAPESP) (C.M.R., grant number 2012/15381-7); and the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (C.C.J., grant number 482261/2010-2). The CIH^{LMU} Centre for International Health at Medical Centre of

the University of Munich is funded by the Federal Ministry for Economic Cooperation and Development (BMZ) and the German Academic Exchange Services (DAAD) through the Excellence Centres for Exchange and Development (EXCEED). The sponsors had no involvement in the study design, in the data collection, in the analysis and interpretation of data, in the writing of the manuscript, and in the decision to submit the article for publication.

DECLARATION OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Bhatt S, *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013; **496**: 504–507.
2. Pinho ACO, *et al.* Asian genotypes of dengue virus 4 in Brazil. *Epidemiology and Infection* 2015; **143**: 3114–3117.
3. Rico-Hesse R. Dengue virus virulence and transmission determinants. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2010; **338**: 45–55.
4. Kuhn RJ, *et al.* Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 2002; **108**: 717–725.
5. Twiddy SS, Holmes EC, Rambaut A. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. *Molecular Biology and Evolution* 2003; **20**: 122–129.
6. Chen SP, *et al.* Identification of a recombinant dengue virus type 1 with 3 recombination regions in natural populations in Guangdong province, China. *Archives of Virology* 2008; **153**: 1175–1179.
7. Mendez JA, *et al.* Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Colombia. *Virology Journal* 2010; **7**: 226.
8. Rodriguez-Barraquer I, *et al.* From re-emergence to hyperendemicity: the natural history of the dengue epidemic in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2011; **5**: e935.
9. Temporão JG, *et al.* Dengue virus serotype 4, Roraima state, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 2011; **17**: 938–939.
10. Health Department of Espírito Santo state. Boletim epidemiológico – n.º. 1 – 2016 – dengue, chikungunya e zika – semana 13–2016. (http://mosquito.saude.es.gov.br/Media/dengue/Boletim%20Epidemiologico/Boletim%20Epid%20Dengue_01_2016_Final.pdf). Accessed 15 July 2017.
11. Brazilian Ministry of Health. Procedimentos hospitalares do SUS por local de internação – Espírito Santo (<http://tabnet.datasus.gov.br/>). Accessed 15 July 2017.
12. Brazilian Ministry of Health 2015. Casos de dengue – Brasil, grandes regiões e unidades federadas, 1990 a 2014. (<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/29/Dengue-at-2014.pdf>). Accessed 15 July 2017.

106 C. R. Vicente and others

13. Koo C, *et al.* Evolution and heterogeneity of multiple serotypes of dengue virus in Pakistan, 2006–2011. *Virology Journal* 2013; **10**: 275.
14. Felix AC, *et al.* Low sensitivity of NS1 protein tests evidenced during a dengue type 2 virus outbreak in Santos, Brazil, in 2010. *Clinical and Vaccine Immunology* 2012; **19**: 1972–1976.
15. Thompson J, *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 1997; **25**: 4876–4882.
16. Posada D. Jmodeltest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 2008; **25**: 1253–1256.
17. Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 2007; **7**: 214.
18. Lanciotti RS, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *Journal of General Virology* 1997; **78**: 2279–2286.
19. Nunes MRT, *et al.* Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010–2011. *Emerging Infectious Diseases* 2012; **18**: 1858–1864.
20. Foster JE, *et al.* Molecular evolution and phylogeny of dengue type 4 virus in the Caribbean. *Virology* 2003; **306**: 126–134.
21. Allicock OM, *et al.* Phylogeography and population dynamics of dengue viruses in the Americas. *Molecular Biology and Evolution* 2012; **29**: 1533–1543.
22. Romano CM, *et al.* Characterization of dengue virus type 2: new insights on the 2010 Brazilian epidemic. *PLoS ONE* 2010; **5**: e11811.
23. Souza RP, *et al.* Dengue virus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: looking beyond the veil. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2011; **5**: e1439.
24. Dettogni RS, Louro ID. Phylogenetic characterization of dengue virus type 2 in Espírito Santo, Brazil. *Molecular Biology Reports* 2012; **39**: 71–80.

9.11 – Artigo: Bicalho CS, Oliveira RR, Pierrotti LC, Fink MC, Urbano PR, Nali LH, Luna EJ, Romano CM, David, David-Neto E, Pannuti CS. 2016. Pretransplant shedding of BK virus in urine is unrelated to post-transplant viruria and viremia in kidney transplant recipients. Clin Transplant. doi: 10.1111/ctr.12752.

Clin Transplant 2016; 30: 796–801 DOI: 10.1111/ctr.12752

© 2016 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

Clinical Transplantation

Pre-transplant shedding of BK virus in urine is unrelated to post-transplant viruria and viremia in kidney transplant recipients

Bicalho CS, Oliveira RR, Pierrotti LC, Fink MCDS, Urbano PRP, Nali LHS, Luna EJA, Romano CM, David DR, David-Neto E, Pannuti CS. Pre-transplant shedding of BK virus in urine is unrelated to post-transplant viruria and viremia in kidney transplant recipients.

Abstract: BK virus (BKV) associated nephropathy (BKVN) is a major cause of allograft injury in kidney transplant recipients. In such patients, subclinical reactivation of latent BKV infection can occur in the pre-transplant period. The purpose of this study was to determine whether urinary BKV shedding in the immediate pre-transplant period is associated with a higher incidence of viruria and viremia during the first year after kidney transplantation. We examined urine samples from 34 kidney transplant recipients, using real-time quantitative polymerase chain reaction to detect BKV. Urine samples were obtained in the immediate pre-transplant period and during the first year after transplant on a monthly basis. If BKV viruria was detected, blood samples were collected and screened for BKV viremia. In the immediate pre-transplant period, we detected BKV viruria in 11 (32.3%) of the 34 recipients. During the first year after transplantation, we detected BKV viruria in all 34 patients and viremia in eight (23.5%). We found no correlation between pre-transplant viruria and post-transplant viruria or viremia ($p = 0.2$). Although reactivation of latent BKV infection in the pre-transplant period is fairly common among kidney transplant recipients, it is not a risk factor for post-transplant BKV viruria or viremia.

C. S. Bicalho^a, R. R. Oliveira^b, L. C. Pierrotti^a, M. C. D. S. Fink^b, P. R. P. Urbano^b, L. H. S. Nali^b, E. J. A. Luna^b, C. M. Romano^b, D. R. David^c, E. David-Neto^d and C. S. Pannuti^b

^aDepartment of Infectious and Parasitic Diseases, University of São Paulo School of Medicine, Hospital das Clínicas, ^bVirology Laboratory, São Paulo Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo,

^cDepartment of Pathology, University of São Paulo School of Medicine and ^dRenal Transplant Division, University of São Paulo School of Medicine Hospital das Clínicas, São Paulo, Brazil

Key words: BKV real-time PCR – BKV replication – kidney transplant recipients – risk factor – viremia – viruria

Corresponding author: Lígia Camera Pierrotti, MD, Hospital das Clínicas – Instituto Central, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, 7º andar – sala 7036, São Paulo, SP 05403-900, Brazil. Tel.: +55 11 26618089; fax: +55 11 26617238; e-mail: pierrot@usp.br

Conflict of interest: None.

Accepted for publication 11 April 2016

The BK virus (BKV) is a ubiquitous polyomavirus with worldwide distribution (1). Infection is acquired during childhood and establishes a life-long infection in the urinary tract completely asymptomatic despite frequent episodes of viral reactivation with shedding into the urine (1, 2). Asymptomatic urinary shedding of BKV occur in up to 10% of general population (3, 4), as evidenced by viral DNA identified with polymerase chain reaction (PCR).

Reactivation of latent BKV infection occurs in 30–50% of all kidney transplant recipients (4–8).

Such reactivation can provoke an inflammatory response in the graft, known as BKV-associated nephropathy (BKVN), which occurs in 1–10% of cases (4, 9–11). Many factors related to the donor determinants, recipient determinants, and post-transplant factors have been shown as potential risk factors for BKV replication (12).

The purpose of this study was to determine whether urinary BKV shedding in the immediate pre-transplant period is associated with a higher incidence of viruria and viremia during the first year after kidney transplantation.

BKV viruria pre- and post-kidney transplant

Patients and methods

Patients and procedures

This was a prospective study conducted in the Renal Transplant Division of the University of São Paulo School of Medicine Hospital das Clínicas, a large tertiary care hospital in the city of São Paulo, Brazil. We enrolled all patients admitted for kidney transplant between August 2010 and September 2011. The inclusion criterion was having had a urine sample collected at admission. After transplantation, urine samples were collected on a monthly basis for one year. We excluded cases in which, for whatever reason, fewer than eight urine samples were collected or two consecutive urine samples were collected more than 60 days apart. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital das Clínicas. All participating patients gave written informed consent.

In the post-transplant period, patients received immunosuppression therapy in accordance with the guidelines of the Renal Transplant Division of the Hospital. The immunosuppression regimen includes induction therapy: polyclonal antithymocyte antibodies (ATG) for patients at high risk for rejection; and monoclonal anti-interleukin-2 receptor antibodies (daclizumab or basiliximab) for patients at low risk for rejection. Maintenance therapy consists of a regimen of two or three drugs, one of which must be prednisone. Other potential drugs include calcineurin inhibitors (cyclosporine or tacrolimus), antimetabolic agents (azathioprine or mycophenolate mofetil/mycophenolate sodium), and mammalian target of rapamycin inhibitors (sirolimus or everolimus).

All urine samples were screened for BKV by real-time quantitative PCR (qPCR). If a urine sample tested positive for BKV, monthly blood samples were then also collected until three consecutive blood samples tested negative or until the end of the follow-up period. BKV DNA was extracted from blood and urine samples using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Biotecnologia Brasil Ltda., São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's protocol.

The number of BKV DNA copies was determined by TaqMan real-time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The nucleotide sequences of the primers and probe were designed from the large T-antigen gene region of BKV. The resulting nucleotide sequences were as follows: GAAACTGAAGACTCTGGACATGG A (sense); GGCTGAAGTATCTGAGACTTGG G (antisense); and CAAGCACTGAATCCCAAT CACAATGCTC (probe) (13). A plasmid standard

containing the large T-antigen-coding region was used to determine the number of copies per milliliter. Analytical sensitivity samples composed of BKV at concentrations of 100, 10, 1, and 0.1 copies/reaction were used in evaluating the sensitivity of the assay. The BKV samples were prepared by serial dilution of a BKV standard. The analytical sensitivity of the qPCR assay was 1000 copies of BKV/1 mL of sample.

Statistical analysis

The Statistical Package for the Social Sciences, version 20.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for data analysis. Categorical variables were compared using Pearson's chi-square test. Student's *t*-test or Mann-Whitney-Wilcoxon test was used for comparison of continuous variables. All *t*-tests were two-tailed, and values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

We recruited a total of 135 kidney transplant recipients (Fig. 1). Among those, 43 were anuric, and there were eight in whom no urine sample had been collected at admission. Therefore, the initial study sample comprised 84 patients. However, over the course of the study, an additional 50 patients were excluded for various reasons (patients who had <8 urine samples collected or two consecutive urine samples collected more than 60 days apart (76%), graft loss (8%), death (8%), and change to another healthcare unit [8%]). Consequently, the final study sample consisted of 34 patients who had been screened for pre-transplant BKV viruria and completed the one-year follow-up. The number of urine samples obtained from each patient ranged from eight to 12 (median, 10).

Demographic and clinical characteristics of the sample are presented in Table 1. Of the 34 patients, 11 (32.3%) tested positive for BKV in the pre-transplant urine sample (Table 2). All of the patients developed post-transplant viruria. However, only eight patients (23.5%) developed post-transplant viremia. Of the 11 patients with pre-transplant viruria, four (36.4%) developed post-transplant viremia, compared with four (17.4%) of the 23 patients without pre-transplant viruria ($p = 0.2$). In the patients with and without pre-transplant BKV viruria, the mean post-transplant BK viral load in urine samples was 7.4 log and 7.9 log, respectively ($p = 0.6$), whereas the mean post-transplant BK viral load in blood samples was 3.6 log and 3.4 log, respectively ($p = 0.6$). As can be seen in Table 3, the mean time (from

Bicalho et al.

Fig. 1. Patient selection for analyzed group of the impact of pre-transplant urine detection of BKV on post-transplant evolution in renal transplant recipients.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the kidney transplant recipients evaluated (n = 34)

	n (%)
Male	18 (52.9)
White	19 (55.9)
Age, years	
18–30	10 (29.4)
31–40	5 (14.7)
41–50	4 (11.8)
51–60	11 (32.4)
>60	4 (11.8)
Deceased donor	20 (58.8)
Induction Therapy	
ATG	15 (44.3)
Monoclonal anti-interleukin-2 receptor antibodies	18 (53.7)
No induction therapy	1 (2)
Immunosuppression maintenance therapy—prednisone, mycophenolate mofetil/mycophenolate sodium and tacrolimus	34 (100)
Retransplant	0 (0)

ATG, antithymocyte antibodies.

transplantation) to post-transplant viruria was 60.0 and 64.4 days, respectively, in the patients with and without pre-transplant BKV viruria ($p = 0.7$), whereas the mean time to post-transplant viremia was 150.0 and 71.5 days, respectively ($p = 0.5$).

Table 2. Post-transplant viruria and viremia according to pre-transplant viruria in the kidney transplant recipients (n = 34)

	Post-transplant			
	Positive viruria		Positive viremia	
Pre-transplant	N	%	N	%
Positive viruria (n = 11)	11	100	4	36.4
Negative viruria (n = 23)	23	100	4	17.4
Total (n = 34)	34	100	8	23.5

The prevalence of viruria and viremia and their median levels before and after transplantation is shown in Table 4.

Discussion

In this prospective study, the authors investigate whether the presence of urinary BKV shedding in the immediate pre-transplant period is associated with a higher incidence of viruria and viremia during the first year after kidney transplant.

Our data indicate that latent BKV infection can reactivate in end-stage renal disease patients undergoing kidney transplantation. Nearly one-third of our patients presented BKV replication in urine samples collected in the immediate pre-

BKV viruria pre- and post-kidney transplant

transplant period. Although Saundh et al. studied 112 renal transplant recipients and found that all pre-transplant urine samples were negative for BKV (14), other authors have confirmed pre-transplant BKV replication in agreement with our results. Hayat et al. reported that 32% of end-stage renal disease patients showed decoy cells in pre-transplant urine (15). Other studies have reported pre-transplant viremia detected by PCR in 20% and 26% of kidney transplant candidates (16, 17).

Our data show that all kidney transplant recipients developed BK viruria at least once during the post-transplant period. These data contradict data of the literature giving mostly a number around 40% of viruria detected by qPCR after kidney transplant using similar screening protocols (12, 18, 19). However, the viremia rate found in our study (23.5%) was similar from those reported by the literature, and there was no difference in induction therapy and maintenance immunosuppression therapy among patients with viremic and non-viremic as shown in Table 1 (18). We have no reason to explain the higher viruria post-transplant found in our study. It is important to mention that we have carried out a BKV surveillance protocol of all kidney transplant recipients during the first-year post-transplant in our hospital since 2011, and the

positivity viruria detected by PCR has been 30% (unpublished data).

We found no relationship between pre-transplant BKV urinary shedding and post-transplant viruria. Although the incidence of viremia was higher in the patients with pre-transplant viruria than in those without (36.4% vs. 17.4%)—viremia developed sooner in the former (71 days vs. 150 days)—the differences were not statistically significant. In addition, we found that even the patients who did not shed BKV in the pre-transplant urine sample displayed BKV viruria at least once during the post-transplant period.

Our findings are quite different from those previously reported. In 2008, Hayat et al. concluded that reactivation of latent BKV infection can occur in end-stage renal disease (ESRD) and increases the risk of graft dysfunction after transplantation (15). Hayat showed that, among those patients with and without pre-transplant urinary BKV shedding detected by decoy cell, 100% and 5% developed viruria post-transplant, respectively (15). However, viruria analyses were performed with *Decoy Cell* and cannot be compared with the molecular analyses we chose for our study (15).

In 2011, Takur et al. found 9.7% positive viruria and 25.8% positive viremia at transplant, although they do not demonstrate correlation between viruria or viremia pre- and post-transplant (17).

In 2014, Mitterhofer et al. studied 60 kidney-transplanted patients from a single cohort in Italy (16). Although the authors found a significant association between BKV replication pre- and post-transplant, the follow-up period was shorter than in our study (16). Furthermore, in the Mitterhofer et al. study, the authors followed younger patients with substantial post-transplant replication. In our study, that was not the case because patients under 18 years old were rolled out.

The difference among our results and the Hayat, Mitterhofer, and Thakur's results cannot be explained by the differences about characteristics of patients, as age, type of donor (living or

Table 3. The mean time to post-transplant viruria and viremia according to pre-transplant viruria in the kidney transplant recipients evaluated (n = 34)

BKV in pre-transplant urine sample	Time to BKV detection after transplantation, days (Mean [SD])	
	Urine samples	Blood samples
No (n = 23)	60.0 (33.9)	150.0 (148.3)
Yes (n = 11)	64.4 (36.8)	71.5 (54.9)
p-value ¹	0.7	0.5

¹Mann-Whitney–Wilcoxon test.
BKV, BK virus.

Table 4. Monthly follow-up of viruria and viremia

		Follow-up (months)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Urine qPCR	N recipients	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34
	Viruria +	15	12	22	16	18	12	14	16	14	10	11	8
Plasma qPCR	Median viral load (cp/mL)	15.860	16.660	4.145	73.000	64.000	15.460	15.850	9383	97.500	62.500	60.000	3.760
	Viremia +	2	2	3	2	2	3	1	2	3	1	3	1
	Median viral load (cp/mL)	1.452	13.235	2.100	2.065	17.793	94.000	31.100	29.000	19.000	13.050	3227	397

Bicalho et al.

deceased donor), retransplant, and ATG induction use did not significantly differ among the studies.

Moreover, previous studies have showed that pre-transplant BKV viremia represents an additional risk factor for post-transplant BKV replication (16, 17).

The origin of BKV in kidney transplant recipients is poorly understood, and studies evaluating the role of donor and recipients BKV on the pathogenesis of BKV infection in the recipient have produced inconclusive results. Indeed, it is likely that both donor and recipient latent BKV play an important role in the dynamics of post-transplant BKV replication.

Because latent BKV can reside in the kidney, the donor origin of BKV is supported by some studies. Donor seropositivity for BKV has been associated with the development of viruria, viremia, and BKVN in children and adults undergoing kidney transplantation (5, 13). In addition, the results of previous studies analyzing sequences of BKV gene segments from kidney transplant donors and recipients have suggested that BKV infection in the recipients originates from the donor organ in at least some cases (13, 20). A recent study showed that donor urinary BKV replication is associated with recipient BKV viremia in kidney transplant (21).

We conclude that urinary BKV shedding in the immediate pre-transplant period is not associated with a higher incidence of viruria and viremia during the first year after kidney transplantation. These results support the current guidelines which do not recommend pre-transplant testing for BKV DNA in urine, blood, or other clinical specimens (22).

Acknowledgements

The authors thank Laura Sumita, Leticia Lima, Giselle Santos, and Sandra Barssotti, for their assistance in the laboratory, and Gislene Bezerra, for providing logistical support.

Funding source

This study was supported by a grant from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo Research Foundation; Grant no. 2010/15.114-3).

Authors' contributions

Concept/design (Ligia C. Pierrotti, Camila S. Bicalho, Renato R. Oliveira, Maria Cristina D. S. Fink, Daísa R. David, Elias David-Neto, Cláudio S. Pannuti), research performance (Camila S. Bicalho, Ligia C. Pierrotti, Renato R. Oliveira,

Maria Cristina D. S. Fink, Paulo Roberto P. Urbano, Luiz Henrique da S. Nali, Daísa R. David), data analysis/interpretation (Ligia C. Pierrotti, Camila S. Bicalho, Renato R. Oliveira, Expedito J. A. Luna, Elias David-Neto), drafting article (Camila S. Bicalho, Ligia C. Pierrotti), critical revision of article (Maria Cristina D. S. Fink, Camila M. Romano, Cláudio S. Pannuti); approval of article (Cláudio S. Pannuti).

References

1. RINALDO CH, TYLDEN GD, SHARMA BN. The human polyomavirus BK (BKPyV): virological background and clinical implications. *APMIS* 2013; 121: 728.
2. HIRSCH HH, STEIGER J, POLYOMAVIRUS BK. *Lancet Infectious Diseases* 2003; 3: 611.
3. EGLI A, INFANTI L, DUMOULIN A et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis* 2009; 199: 837.
4. ZHONG S, ZHENG HY, SUZUKI M et al. Age-related urinary excretion of BK polyomavirus by nonimmunocompromised individuals. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 193.
5. HIRSCH HH, KNOWLES W, DICKENMANN M et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 2002; 347: 488.
6. NICKELEIT V, KLIMKAIT T, BINET IF et al. Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. *N Engl J Med* 2000; 342: 1309.
7. DRACHENBERG CB, HIRSCH HH, PAPADIMITRIOU JC et al. Polyomavirus BK versus JC replication and nephropathy in renal transplant recipients: a prospective evaluation. *Transplantation* 2007; 84: 323.
8. VISCONTI HB, EID AJ, ESPY MJ et al. Polyomavirus polymerase chain reaction as a surrogate marker of polyomavirus-associated nephropathy. *Transplantation* 2007; 84: 340.
9. ALMÉRAS C, FOULONGNE V, GARRIGUE V et al. Does reduction in immunosuppression in viremic patients prevent BK virus nephropathy in *de novo* renal transplant recipients? A prospective study. *Transplantation* 2008; 85: 1099.
10. RANDHAWA PS, FINKELSTEIN S, SCANTLEBURY V et al. Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation* 1999; 67: 103.
11. BINET I, NICKELEIT V, HIRSCH HH et al. Polyomavirus disease under new immunosuppressive drugs: a cause of renal graft dysfunction and graft loss. *Transplantation* 1999; 67: 918.
12. HIRSCH HH, VINCENTI F, FRIMAN S et al. Polyomavirus BK replication in *de novo* kidney transplant patients receiving tacrolimus or cyclosporine: a prospective, randomized, multicenter study. *Am J Transplant* 2013; 13: 136.
13. PAL A, SIROTA L, MAUDRU T, PEDEN K, LEWIS AM. 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.
14. SAUNDH BK, BAKER R, HARRIS M, SMITH MPW, CHERUKURI A, HALE A. Early BK polyomavirus (BKV) reactivation in donor kidney is a risk factor for development of BKV-associated nephropathy. *J Infect Dis* 2013; 207: 137.

BKV viruria pre- and post-kidney transplant

15. HAYAT A, MUKHOPADHYAY R, RADHIKA S et al. Adverse impact of pretransplant polyoma virus infection on renal allograft function. *Nephrology* 2008; 13: 157.
16. MITTERHOFER AP, TINTI F, PIETROPAOLO V et al. Role of BK virus infection in end-stage renal disease patients waiting for kidney transplantation - viral replication dynamics from pre- to post-transplant. *Clin Transplant* 2014; 28: 299.
17. THAKUR R, ARORA S, NADA R, MINZ M, JOSHI K. Prospective monitoring of BK virus reactivation in renal transplant recipients in North India. *Transpl Infect Dis* 2011; 13: 575.
18. BRENNAN DC, AGHA I, BOHL DL et al. Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of pre-emptive immunosuppression reduction. *Am J Transplant* 2005; 5: 582.
19. KOUKOULAKI M, GRISPOU E, PISTOLAS D et al. Prospective monitoring of BK virus replication in renal transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2009; 11: 1.
20. VERA-SEMPERE FJ, RUBIO L, FELIPE-PONCE V et al. Renal donor implication in the origin of BK infection: analysis of genomic viral subtypes. *Transplant Proc* 2006; 38: 2378.
21. VERGHESE PS, SCHMELING DO, KNIGHT JA, MATAS AJ, BALFOUR HH. The impact of donor viral replication at transplant on recipient infections posttransplant. *Transplantation* 2015; 99: 602.
22. HIRSCH HH, BABEL N, COMOLI P et al. European perspective on human polyomavirus infection, replication and disease in solid organ transplantation. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20(Suppl 7): 74.

9.12 – Artigo: Fujita DM, Nali LH, Urbano PR, Soeiro DM, Andrade HF Jr. 2016. The fast transmission of infectious diseases around the world - a new concern to the public health. *Braz J Infect Dis.* pii: S1413-8670(16)30111-8. doi: 10.1016/j.bjid.2016.06.003

BRAZ J INFECT DIS 2016;20(5):513-515

The Brazilian Journal of INFECTIOUS DISEASES

www.elsevier.com/locate/bjid

Letter to the Editor

The fast transmission of infectious diseases around the world – a new concern to the public health

Dear Editor,

The high number of people traveling around the world (1,184,000,000 trips in 2015) with ~45% participation of emerging countries tourists, allied to their hostage of international sportive mass gatherings events (Fig. 1A and B), increase the potential risk for infectious diseases transmission due to emerging countries recently challenged public health systems still devoted to endemic diseases issues associated to older policy.¹

International travelers from emerging countries, like Brazil, seems to be different to most country people with distinct social status and better health, shown by travel expenditure and travel insurance claims (Fig. 1C and D), corroborating to the “healthy immigrant effect”.²

Imported infectious diseases represent a new problem for these international travelers, where we see outbreaks caused by people visiting endemic or risky areas, including developed countries, and bring back previously controlled diseases like measles and mumps in Brazil – 2014/2015.³

The infectious disease control imposed by some nations, due to increased travel, leads to rethinking public health as a larger phenomenon. The current models of border surveillance, either by entry visa, limited length of stay or mandatory travel insurance (Schengen Convention), do not seem as effective in preventing the migration of infectious diseases transported both by foreign visitors or returning travelers. As an example, the recent Zika Virus epidemic in Brazil and fast worldwide spread, possibly a large-scale pandemic, promoted a global mobilization to control and study a new emerging disease,⁴ denoting the discussion of an important topic:

infectious diseases are no longer limited to governmental borders or poor nations, they are a worldwide problem, especially the neglected ones.

Emerging countries with recently established public health systems are exquisitely exposed to new diseases outbreaks due to the recent increasing international travel, requiring more preventive measures both for border surveillance or control of their returning travelers, in a challenge for their endemic diseases dedicated systems. The full implementation of WHO's 2005 International Health Regulations, which includes the International Certificate of Vaccination and Prophylaxis, is mainly oriented to developed countries. Revision of these Regulations is required both to include this newcomer emerging systems but also vaccine-preventable diseases transferred from developed countries.⁵ Travel Insurance should be an important tool due to the possibility of travelers to receive medical treatment that would prevent bringing back infectious diseases to their home countries.

We believe that it is mandatory to create a unique global network in order to improve the notification of easily transmitted diseases and also unknown diseases, where everyone should adopt rigid protocols to provide information regarding new or current outbreaks. In addition, all data must be available for all nations, which could ultimately lead health policy makers around the world to get full access regarding all unified outbreak alerts. Probably, we could tackle H1N1, Ebola, and Zika virus epidemics more effectively and maybe researchers could gather more information to eventually help Health Authorities to prevent future epidemics, and speed up treatment of sick people.

Fig. 1 – A – International tourism in the world (triangles)/advanced (dots) or emerging (squares) countries, expressed as millions of arrivals (closed symbols). B – Percentage of world arrivals from each origin. Dotted lines represent the 95% confidence interval of regression lines. p-Values are the comparison of slopes between regressions. C – Expenditure of Brazilian tourists abroad. D – Travel insurance indexes of Brazilian tourists abroad. Straight lines represent regression lines and correspondent interrupted lines represent the 95% confidence intervals.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the assistance from Instituto de Medicina Tropical de São Paulo-USP, LIM – 49/LIM – 52-HCFMUSP, FAPESP and CAPES.

REFERENCES

1. Hunter P. Tropical diseases and the poor: neglected tropical diseases are a public health problem for developing and developed countries alike. *EMBO Rep.* 2014;15:347–50.

2. Kwak K. An evaluation of the healthy immigrant effect with adolescents in Canada: examinations of gender and length of residence. *Soc Sci Med.* 2016;157:87–95.
3. Nali LH, da S, Fujita DM, et al. Potential measles transmission risk in mass gatherings: are we safe for the Olympic games-Rio 2016? *J Travel Med.* 2016;23.
4. De Cock KM, Simone PM, Davison V, Slutsker L. The new global health. *Emerg Infect Dis.* 2013;19:1192–7.
5. Steffen R, Behrens RH, Hill DR, Greenaway C, Leder K. Vaccine-preventable travel health risks: what is the evidence – what are the gaps? *J Travel Med.* 2015;1:1–12.

Dennis Minoru Fujita^{a,*}, Luiz Henrique da Silva Nali^b, Paulo Roberto Urbano^b, Débora Maringoni Soeiro^a, Heitor Franco de Andrade Jr.^a

^a Universidade de São Paulo (USP), Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratório de Protozoologia, São Paulo, SP, Brazil

^b Universidade de São Paulo (USP), Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratório de Virologia, São Paulo, SP, Brazil

* Corresponding author.

E-mail address: dmfujita@usp.br (D.M. Fujita).

Received 23 May 2016

Accepted 27 June 2016

Available online 26 July 2016

1413-8670/© 2016 Sociedade Brasileira de Infectologia.

Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2016.06.003>

9.13 – Artigo: Urbano PR, Pannuti CS, Pierrotti LC, David-Neto E, Romano CM. 2014. Rapid detection of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in skin biopsy specimen. *Genome Announc.* 2;4:e00694-14. doi:10.1128/genomeA.00694-14.

Rapid Detection of Trichodysplasia Spinulosa-Associated Polyomavirus in Skin Biopsy Specimen

Paulo Roberto P. Urbano,^a Cláudio Sérgio Pannuti,^a Lígia C. Pierrotti,^b Elias David-Neto,^c Camila Malta Romano^a

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias (IIM-52), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil^a; Departamento de Moléstias Infecciosas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil^b; Departamento de Urologia, Serviço de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil^c

Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (TSV) is responsible for a rare skin cancer. Using metagenomic approaches, we determined the complete genome sequence of a TSV first detected in Brazil in spicules of an immunocompromised patient suspected to have trichodysplasia spinulosa.

Received 17 June 2014 Accepted 3 July 2014 Published 24 July 2014

Citation Urbano PRP, Pannuti CS, Pierrotti LC, David-Neto E, Romano CM. 2014. Rapid detection of trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in skin biopsy specimen. *Genome Announc.* 2(4):e00694-14. doi:10.1128/genomeA.00694-14.

Copyright © 2014 Urbano et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/). Address correspondence to Camila Malta Romano, cmromano@usp.br.

Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (TSV) was identified in 2010 in a patient suffering from trichodysplasia spinulosa (TS), a rare skin disease characterized by the development of follicular papules and keratin spicules (1). Trichodysplasia spinulosa (TS) is very rare and has a similar pattern among affected patients, demonstrating hair follicle dilatation and keratotic plugging of the infundibulum and keratin spicules, which is most prominent in the central facial region (2–4). As with other polyomaviruses, TSV has a circular genome, and the orientation and size of its open reading frames (ORFs) (VP1, VP2, VP3, and T-antigen [LT-ag]), as well as the presence of a noncoding control region (NCCR) in between, are similar to those of the other members from this family (5).

In 2013, a skin biopsy specimen suspected to be infected with TS was received in the Laboratory of Virology of the Institute of Tropical Medicine in São Paulo for diagnostic workup. The patient was an immunocompromised renal recipient presenting spicules in the central facial region resembling those observed during classical TS presentation. In order to investigate the presence of TSV and any putative DNA virus, we performed a viral metagenomic analysis on this sample. The initial treatment with DNase was performed in the macerate tissue to remove all DNA-free molecules, leaving only the encapsulated intact virus. The sample was then directly sequenced in the Ion Torrent platform.

De novo assembly of the reads revealed the presence of trichodysplasia spinulosa virus in the sample. The full genome is 5,235 nucleotides long, and a similarity analysis revealed that the virus found in Brazil is the most divergent among the four TSV genomes already reported from Japan, the Netherlands, and the United States. While the genetic distance (*D*) between Brazilian TSV and United States/Netherlands/Japan TSV was around 0.008, *D* values of 0.004 and 0.0009 were obtained from comparisons between viruses from Japan and the United States–Netherlands, and the United States and the Netherlands, respectively. Using

sequences from the Netherlands and the United States as references, the Brazilian TSV presented a total of 45 polymorphisms (42 single nucleotide substitutions [SNPs] and 3 indels). The NCCR region comprises 11 SNPs and all identified indels. One specific nucleotide change (G to C at position 5118) is located in a GC-rich region near a binding site for LT-ag, GCCTCTG/C (where underlining indicates the LT-ag binding site and boldface indicates the nucleotide change) (6). The VP1 gene presented six nucleotide changes, VP2 had three (two of them also in the VP3 frame), and LT-ag showed 16 SNPs. The only nonsynonymous change was found in LT-ag, at site 349 (I to T) of the amino acid sequence.

Over the past few years, several human polyomaviruses have been discovered through new sequencing technologies. Nevertheless, few studies were dedicated to the functional and molecular characterization of these new members, and much remains unknown. Here, we report the fifth TSV complete genome, which is also the first detection of this virus made in South America.

Nucleotide sequence accession number. The genomic sequence of the TSV Brazilian strain has been deposited in GenBank under the accession no. [KM007161](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/KM007161).

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by FAPESP #2012/15381-7.

We thank Roberto Ribeiro for assistance with Ion Torrent sequencing.

REFERENCES

- van der Meijden E, Janssens RW, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbelenya AE, Feltkamp MC. 2010. Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromised patient. *PLoS Pathog.* 6:e1001024. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001024>.
- Haycox CL, Kim S, Fleckman P, Smith LT, Piepkorn M, Sundberg JP, Howell DN, Miller SE. 1994. Trichodysplasia spinulosa: a newly described folliculo centric viral infection in an immunocompromised host. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 4:268–271.
- Lee JS, Frederiksen P, Kossard S. 2008. Progressive trichodysplasia spinu-

Urbano et al.

- losa in a patient with chronic lymphocytic leukaemia in remission. *Australas. J. Dermatol.* 49:57–60. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-0960.2007.00422.x>.
4. Sadler GM, Halbert AR, Smith N, Rogers M. 2007. Trichodysplasia spinulosa associated with chemotherapy for acute lymphocytic leukaemia. *Australas. J. Dermatol.* 48:110–114. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-0960.2007.00348.x>.
 5. Schwieger-Briel A, Balma-Mena A, Ngan B, Dipchand A, Pope E. 2010. Trichodysplasia spinulosa—a rare complication in immunosuppressed patients. *Pediatr. Dermatol.* 27:509–513. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1525-1470.2010.01278.x>.
 6. Van Ghelue M, Khan MT, Ehlers B, Moens U. 2012. Genome analysis of the new human polyomaviruses. *Rev. Med. Virol.* 22:354–377. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.1711>.

9.14 – Artigo: Fujita DM, Nali LHS, Urbano PR, Luna EJA. Sexual education for senior age: Continuous increase in reported cases of HIV in Brazil – 2005/2015. 2018. Biomed J Sci & Tech Res. In press. DOI: 10.26717/BJSTR.2018.02.000782

DOI: 10.26717/BJSTR.2018.02.000782

Dennis Minoru Fujita. Biomed J Sci & Tech Res

ISSN: 2574-1241

Opinion

Open Access

Sexual Education for Senior Age: Continuous Increase Inreported Cases of HIV in Brazil - 2005/2015

Dennis Minoru Fujita*, Luiz Henrique da Silva Nali, Paulo Roberto Palma Urbano and Expedito José de Albuquerque Luna

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, USP Lab, Brazil

Received: January 29, 2018; **Published:** February 21, 2018

*Corresponding author: Dennis Minoru Fujita, Av Dr Enéas Carvalho de Aguiar, 470 - 2º andar, São Paulo - Brazil, Tel: 551130613684; Email: dmfujita@usp.br

Introduction

The economic development in emerging countries promoted an increase of access for new medical technologies and services which improve the life expectancy of your population at last 10 years [1]. In Brazil, the increase of senior group is accompanied by new demands for a better quality of life, based on the interaction and social integration of the elderly [2]. However, this social renaissance may be followed by agents that did not represent a risk for this group [3]. Either by lack of preventive knowledge or by the cultural conduct to not use condoms, in the past, of this generation. Our study assessed the number of HIV-infected from Brazilian Ministry of Health public database (DATASUS) during the last 10 years. We focused on analyzing the frequency in senior age group, which was divided in the following distribution by age: 60-64, 65-69, 70-74, 75-79 and 80+ years old. We compared the price's evolution from the two main drugs for erectile dysfunction (Drug 1 and Drug 2) at Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA database in the last 10 years. Today, there are ~36.7 million people infected by HIV in the world, whereas in Brazil there was an increase in estimated number of people (all ages) living with HIV (n~700.000 in 2010/ n~830.000 in 2015) in Brazil, with an estimative of ~15.000 deaths/year [4].

In Brazil, the group from 60 to 64 years old (Table 1A) initially presented a considerable number of HIV reported cases (n=5069 - 2005) by different transmission routes of infection including sex and still concern after 10 years in this specific age group (n= 7797 - 2015) with an increase of 53.82%. The last age group (80+ years) presents a considerable estimated prevalence of HIV (n=2.112 in 2005/n=3.308 in 2015) presenting an increase of 56.63%. This result might be explained by multiple reasons as follows: The drugs for erectile dysfunction presented more options of dosage with the reduction of the active ingredient (Drug 1 - 25 mg, 50 mg

and 100 mg / Drug 2 - 20 mg) and consequent price reduction, (Drug 1 - R\$24.210 - 25mg - 1 pill / Drug 2- R\$52.49- 20 mg -1 pill) which provide more presence and availability to a larger group of consumers in Brazil according to ANVISA's database in 2016 (Table 1B). The increase in Brazilian life expectancy present a continuous growth that was 9.8% in 2005 and in 2015, the last available data, was 14.3% shows us new problems related to the resocialization in old age, which includes the right to leisure, group activities and even sexual activity.

Considering the diversity of drugs for erectile dysfunction available in the market and their relative decrease in price over the last 10 years in Brazil, allied to the growing participation of old group in dating apps (56 to 64 year olds - doubled the use of online dating services from 2013 to 2015) (Table 1C) [5]. The estimative of individuals living with HIV in all old age group in Brazil (60 to 80 years old - n=23.940 in 2015), and the constant increase of reports at last 10 years (>86.17%), may be consider as a consequence from a unexpected problem (Figure 1). Probably, the monogamous behavior induced by social and religious precepts protected this population at past, but in the search for a new companion, they may develop unprotected sex because contraception was the big problem at their young age, and disregard the dangers of sexually transmitted diseases, since they were a problem related only to people with "questionable character", as drug addicts [6]. Emerging countries have similar growth of their elderly population and may present the same problems with considerable development of sexually transmitted diseases in the senior age. We may consider urgent a sexual education program for this special age group, and maybe a more specific palliative method in the sale of these drugs to this group, due to this continuous increase in HIV prevalence in old age.

Table 1A: Estimated Prevalence of HIV in Elder People-Brazil.

Year	60 – 64	65 – 69	70 – 74	75 – 79	80 >	Total
2005	5.069	4.063	2.989	2.133	2.112	16.367

Cite this article: Dennis M F, Luiz H d S N, Paulo R P U, Expedito J d A L. Sexual Education for Senior Age: Continuous Increase Inreported Cases of HIV in Brazil - 2005/2015. Biomed J Sci & Tech Res 2(3) - 2018. BJSTR.MS.ID.000782. DOI: 10.26717/BJSTR.2018.02.000782

1/3

2006	5.271	4.162	3.082	2.190	2.211	16.918
2007	5.513	4.250	3.194	2.239	2.322	17.520
2008	5.783	4.343	3.314	2.287	2.440	18.170
2009	6.065	4.462	3.430	2.345	2.560	18.864
2010	6.348	4.621	3.535	2.418	2.677	19.601
2011	6.633	4.817	3.631	2.504	2.795	20.382
2012	6.919	5.048	3.719	2.605	2.915	21.208
2013	7.207	5.306	3.810	2.713	3.039	22.077
2014	7.499	5.575	3.925	2.818	3.169	22.988
2015	7.797	5.844	4.076	2.913	3.308	23.938
Increase (%)	>53.82%	>43.83%	>36.37%	>36.57%	>56.63%	>46.26%

Table 1B: Price Evolution (BRL Currency*) - Erectile Dysfunction Drugs.

Year	Drug 1 25mg 4Pills	Drug1 50 mg 1Pill	Drug1 50 mg 4Pills	Drug1 100mg 4Pills	Drug2 20mg 1Pill	Drug2 20mg 2Pills	Drug2 20mg 4Pills	Drug 20mg 8 Pills
2005	106.01	-	116.54	182.47	-	69.92	139.83	279.68
2006	107.08	-	117.72	184.29	-	70.62	141.23	282.47
2007	107.08	-	117.72	184.29	-	70.62	141.23	282.47
2008	116.25	-	127.8	200.08	-	76.67	153.34	306.67
2009	116.25	-	127.8	200.08	-	76.67	153.34	306.67
2010	121.43	-	133.48	208.98	-	80.08	160.15	320.32
2011	62.86	17.28	138.21	108.19	-	82.93	165.82	331.66
2012**	66.54	18.29	146.29	114.52	-	87.77	175.52	351.07
2013	70.75	19.44	155.53	121.75	46.66	93.32	186.59	373.22
2014	74.77	20.55	164.36	128.66	49.31	98.61	197.19	394.43
2015	78.51	21.58	129.76	101.58	46.65	93.3	186.57	373.19

Figure 1: If the overall slopes were identical, there is less than a 0.01% chance of randomly choosing data points with slopes this different. We can conclude that the differences between the slopes are extremely significant. Because the slopes differ so much, it is not possible to test whether the intercepts differ significantly.

Table 1C: HIV Positive Cases Reported/Age - Brazil - 2005/2016.

Year	Age Group												
	< 1	1-4	5-9	10-14	15-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	80 >	NC***
2005	328	487	380	201	547	8.298	13.581	9.303	3.598	909	184	28	4
2006	303	387	299	190	593	8.056	13.155	9.362	3.535	1.026	198	29	0
2007	288	329	277	221	584	8.239	13.288	9.633	3.937	1.075	258	34	0
2008	279	344	241	236	688	8.856	13.571	10.267	4.472	1.268	242	43	1
2009	265	322	208	202	674	8.895	13.590	10.099	4.463	1.358	255	37	0
2010	268	302	196	172	670	8.920	13.018	10.031	4.677	1.305	277	36	0
2011	281	212	165	178	763	9.379	13.869	10.433	4.789	1.402	326	48	0
2012	222	274	122	157	850	9.542	13.417	10.071	4.899	1.495	314	54	12
2013	199	250	119	133	952	9.981	13.402	9.995	5.130	1.681	353	60	11
2014	212	212	120	117	1.000	9.807	12.867	9.468	5.109	1.657	363	71	4
2015	199	182	96	88	951	9.546	12.165	8.771	5.028	1.683	342	62	0

Acknowledgment

The authors wish to acknowledge the assistance from Institute de Medicina Tropical de São Paulo - USP, LIM - 49 / LIM - 52 - HCFMUSP, FAPESP and CAPES.

References

1. Mondal MNI, Shitan M (2013) Impact of Socio-Health Factors on Life Expectancy in the Low and Lower Middle Income Countries. Iran J Public Health [Internet]. Tehran University of Medical Sciences 42: 1354-1362.
2. da Fonte E, Feitosa PH, de Oliveira Neto LT, de Araújo CL, Figueiroa JN, et al. (2016) Effects of a physical activity program on the quality of life among elderly people in Brazil. J Fam Med Prim Care 5: 139-142.
3. Fagundes LJ, Vieira EE, Moysés ACMC, Lima FD de, Moraes FRB de, et al. (2013) Sexually transmitted diseases in a specialized STD healthcare center: epidemiology and demographic profile from January 1999 to December 2009. An Bras Dermatol 88: 523-529.
4. (2017) World Health Organization. WHO - HIV WHO, World Health Organization.
5. Kevin Murnane (2016) Report Shows More People Of All Ages Are Dating Online.
6. Batista AFO, Marques APO, Leal MCC, Marino JG, Melo JMA (2011) Idosos: Associação entre o conhecimento da aids, atividade sexual e condições sociodemográficas. Rev bras geriatr gerontol 14: 39-48.

This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 License

Submission Link: <http://biomedres.us/submit-manuscript.php>

Assets of Publishing with us

- Global archiving of articles
- Immediate, unrestricted online access
- Rigorous Peer Review Process
- Authors Retain Copyrights
- Unique DOI for all articles

<http://biomedres.us/>