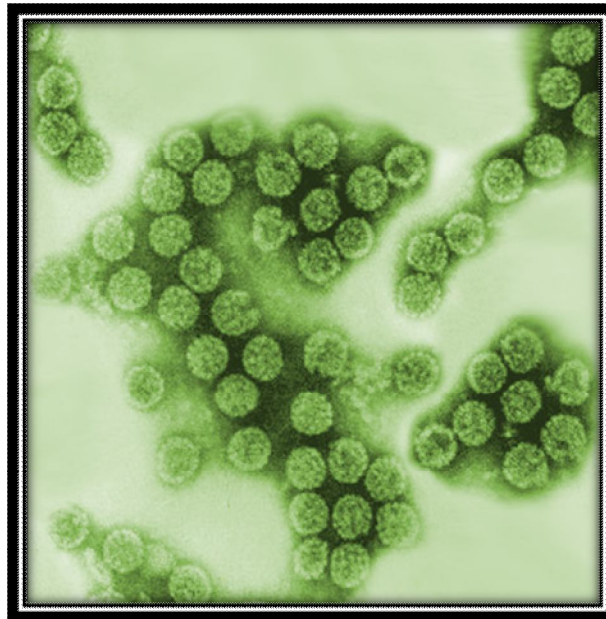


UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Desenvolvimento de Metodologias de Diagnóstico e Caracterização Molecular de Poliomavírus



Rita Susana da Silva Ferreira

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR HUMANA

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Desenvolvimento de Metodologias de Diagnóstico e Caracterização Molecular de Poliomavírus

Rita Susana da Silva Ferreira

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR HUMANA

Dissertação de Mestrado Orientado pela Doutora Ângela Maria Chambel Pista e pela
Professora Doutora Maria Filomena Ribeiro Alcobia da Silva Trabucho Caeiro

2009

Projecto de Mestrado desenvolvido no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Sexualmente Transmissíveis para o Vírus do Papiloma humano, Poliomavírus, Vírus Herpes genital, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Agradecimentos

A todos os que, de uma forma directa ou indirecta, me apoiaram, aconselharam e incentivaram na concretização desta Dissertação de Mestrado, etapa importante da minha vida profissional, expresso o meu mais sincero agradecimento, sem esquecer a Instituição que me acolheu, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge de Lisboa, na pessoa do seu Presidente Doutor José Pereira Miguel. Manifesto um especial reconhecimento:

à minha orientadora Doutora Ângela Pista, Investigadora Auxiliar da Carreira de Investigação do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge de Lisboa, pela confiança com que aceitou supervisionar o meu estágio, pela participação, pela disponibilidade constante e pela sua rigorosa e crítica revisão do trabalho,

ao Dr. Nuno Verdasca, Assistente de Saúde da Carreira de Técnicos Superiores de Saúde do Laboratório Nacional de Referência de Infecções Sexualmente Transmissíveis para o Vírus do Papiloma humano, Poliomavírus, Vírus Herpes genital, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, pela participação, pela ajuda e pela disponibilidade incondicionais,

à Sr.^a D. Fátima Ribeiro, Técnica de Análises Clínicas de Saúde Pública de 1^a Classe do Laboratório Nacional de Referência de Infecções Sexualmente Transmissíveis para o Vírus do Papiloma humano, Poliomavírus, Vírus Herpes genital, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, pela ajuda, pela participação e pela disponibilidade que sempre demonstrou,

à Prof.^a Doutora Maria Teresa Paixão, Acessora do Centro de Virologia do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, pela confiança com que aceitou o estágio,

a todo o pessoal do Departamento de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge que possibilitou a conclusão deste trabalho, pelo acompanhamento, pela disponibilidade e pela ajuda demonstradas,

à minha co-orientadora, Prof.^a Doutora Maria Filomena Caeiro, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia Vegetal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, pelos conselhos, pela compreensão e pela disponibilidade constantes,

à minha mãe, Anabela, pela força que sempre me deu, pelo carinho e compreensão incondicionais, por ter acreditado sempre em mim e por nunca me ter deixado desistir nos momentos menos bons,

ao meu pai, Henrique , pela disponibilidade constante e por ter atendido sempre aos meus pedidos e necessidades,

à minha irmã, Inês, pelo apoio e pelo bom-humor que sempre me transmitiu, nos momentos mais críticos do meu percurso profissional, e ao qual nem sempre consegui dar o verdadeiro valor,

ao meu avô, Augusto, pela preocupação constante e pelas lágrimas de orgulho que tantas vezes me motivaram,

à minha avó, Laurinda, pelos conselhos e ensinamentos que sempre me transmitiu e que me ajudaram a crescer profissionalmente e como pessoa,

ao meu namorado, Hugo, pela enorme compreensão demonstrada e pelo sempre presente apoio emocional,

à minha avó, Lisete, pela prontidão e pela disponibilidade com que me recebeu em sua casa que possibilitaram a minha estadia em Lisboa.

A todos, o meu mais sincero Obrigado! A vossa participação foi muito importante e agradeço-vos do fundo do coração por isso.

Um Abraço.

Nota de Abertura

A presente dissertação destina-se à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular Humana, pela Faculdade de Ciências, da Universidade de Lisboa. O trabalho prático foi realizado no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Sexualmente Transmissíveis para o Vírus do Papiloma humano, Poliomavírus, Vírus Herpes genital, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), tendo a orientação sido da responsabilidade da Doutora Ângela Pista, coordenadora do referido laboratório e Investigadora Auxiliar da Carreira de Investigação desta Instituição.

O trabalho prático teve início em Setembro de 2008, com integração nas actividades desenvolvidas no Laboratório, e após uma fase de aprendizagem das técnicas laboratoriais utilizadas no diagnóstico da infecção pelos Poliomavírus humanos. Para o trabalho experimental, foram utilizadas extracção de DNA, PCR, QPCR e sequenciação.

A publicação e trabalho efectuados durante o presente projecto foram:

Ferreira R, Verdasca N, Ribeiro F, Pista A. Quantificação e caracterização molecular do poliomavírus BK detectado na urina de indivíduos imunocomprometidos.

3º Congresso Nacional de Virologia/VII Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Virologia 2009, Coimbra, Portugal [Poster]

Ferreira R, Oliveira A, Verdasca N, Ribeiro F, Pista A. Molecular Characterization of JC Polyomavirus in the LCR of HIV Seropositive Portuguese Patients. 2009, *in preparation*.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABELAS	v
ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
OBJECTIVOS	x

CAPÍTULO I 1

INTRODUÇÃO 1

1. OS POLIOMAVÍRUS	1
1.1. Conceitos Gerais	1
1.1.1. Classificação, estrutura e organização genómica	1
1.1.2. Transcrição e replicação do DNA viral	2
1.2. O Poliomavírus JC (JCV)	3
1.3. O Poliomavírus BK (BKV)	5
1.4. O Poliomavírus KI (KIV)	6
1.5. O Poliomavírus WU (WUV)	7
1.6. O Poliomavírus MC (MCV)	7

CAPÍTULO II 9

MATERIAIS E MÉTODOS 9

1. PLANOS DO TRABALHO EXPERIMENTAL	9
1.1. Estudo dos Poliomavírus BK e JC	9
1.2. Estudo do Poliomavírus WU	10
1.3. Estudo do Poliomavírus KI	10
1.4. Estudo do Poliomavírus MC	10

2. DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS DE DETECÇÃO QUALITATIVA DOS POLIOMAVÍRUS BK, KI, WU E MC	11
2.1. Produtos Biológicos	11
2.2. Extracção do DNA	11
2.3. Sequências de <i>Primers</i>	11
2.4. Optimização da PCR	12
2.5. Análise em Gel de Agarose	13
2.6. Purificação dos Produtos da PCR	13
2.7. Reacção de Sequenciação	13
2.8. Análise de Sequências	14
3. DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS DE DETECÇÃO QUANTITATIVA DOS POLIOMAVÍRUS JC E WU E QUANTIFICAÇÃO DOS POLIOMAVÍRUS JC E BK	14
3.1. Produtos Biológicos	14
3.2. Extracção do DNA	14
3.3. Sequências de <i>Primers</i> e de Sondas <i>TaqMan</i> [®]	14
3.4. Preparação de Calibradores	15
3.5. Optimização da QPCR	15
3.6. Quantificação dos Poliomavírus JC e BK	15
3.7. Análise Estatística	16
4. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS POLIOMAVÍRUS JC E BK	16
4.1. Produtos Biológicos	16
4.2. Extracção do DNA	16
4.3. PCR para a Caracterização Molecular	16
4.4. Análise em Gel de Agarose	17
4.5. Purificação dos Produtos da PCR	17
4.6. Reacção de Sequenciação	17
4.7. Análise de Sequências	17
4.8. Análise Filogenética	18

CAPÍTULO III	19
RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
1. DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS DE DETECÇÃO QUALITATIVA DOS POLIOMAVÍRUS BK, KI, WU E MC	19
1.1. Sequências de <i>primers</i>	19
1.2. Optimização da PCR	19
1.3. Sequenciação	20
2. DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS DE DETECÇÃO QUANTITATIVA DOS POLIOMAVÍRUS JC E WU E QUANTIFICAÇÃO DOS POLIOMAVÍRUS JC E BK	21
2.1. Sequências de <i>primers</i> e sondas <i>TaqMan</i> [®]	21
2.2. Optimização da QPCR	21
2.3. Quantificação dos Poliomavírus JC e BK	22
3. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS POLIOMAVÍRUS JC E BK	24
CAPÍTULO IV	26
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	26
BIBLIOGRAFIA	27
ANEXOS	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da organização genómica de um Poliomavírus	1
Figura 2 – Representação esquemática da relação filogenética entre os cinco Poliomavírus humanos	2
Figura 3 – Representação esquemática do ciclo replicativo dos Poliomavírus no interior da célula do hospedeiro	3
Figura 4 – Representação esquemática da distribuição geográfica dos tipos do Poliomavírus JC	3
Figura 5 – Imagem de uma lesão típica de MCC	8
Figura 6 – Resultados da optimização da PCR dos Poliomavírus BK, KI, WU e MC	33
Figura 7 – Exemplo de uma recta de calibração da quantificação do Poliomavírus JC	33
Figura 8 – Exemplo de uma recta de calibração da quantificação do Poliomavírus WU	34
Figura 9 – Exemplo de uma recta de calibração da quantificação do Poliomavírus BK	34
Figura 10 – Árvore filogenética do Poliomavírus JC	35
Figura 11 – Árvore filogenética do Poliomavírus BK	35

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I – Poliomavírus isolados de pacientes humanos	2
Tabela II – Sequências de <i>primers</i> utilizados nas PCR dos Poliomavírus BK, KI, WU e MC	12
Tabela III – Condições das PCR e respectivos perfis de amplificação dos Poliomavírus BK, KI, WU e MC	13
Tabela IV – Condições da reacção de sequenciação e perfil de amplificação dos Poliomavírus BK, KI, WU e MC	14
Tabela V – Sequências de <i>primers</i> e sondas utilizadas na QPCR dos Poliomavírus JC e WU	14
Tabela VI – Condições da QPCR e perfil de amplificação dos Poliomavírus JC e WU	15
Tabela VII – <i>Primers</i> para a caracterização molecular do Poliomavírus JC	16
Tabela VIII – Condições da PCR e perfil de amplificação do Poliomavírus JC	16
Tabela IX – Grelha para a caracterização molecular do Poliomavírus JC	17
Tabela X – Grelha para a caracterização molecular do Poliomavírus BK	17
Tabela XI – Grelha para a determinação dos subtipos do tipo I do Poliomavírus BK	18
Tabela XII – Resultados da detecção qualitativa do Poliomavírus BK	19
Tabela XIII – Comparação dos resultados da QPCR <i>in house</i> do Poliomavírus JC com o painel de avaliação externa de qualidade QCMD de 2008	21
Tabela XIV – Comparação dos resultados da quantificação do Poliomavírus JC obtidos por dois métodos diferentes	22
Tabela XV – Comparação dos resultados da QPCR comercial do Poliomavírus BK com o painel de avaliação externa de qualidade QCMD de 2008 e de 2009	23
Tabela XVI – Comparação dos resultados da quantificação do Poliomavírus BK obtidos pelo sistema comercial e pelo painel de avaliação externa de qualidade QCMD de 2008 e de 2009	23
Tabela XVII – Distribuição dos casos positivos para o Poliomavírus JC estudados ($n = 53$) em função do género e da infecção por VIH	24
Tabela XVIII – Percentagem dos diferentes tipos do Poliomavírus JC identificados	24
Tabela XIX – Percentagem dos diferentes tipos do Poliomavírus BK identificados	25
Tabela XX – Condições da PCR utilizada na confirmação dos clones dos Poliomavírus JC e WU obtidos	32

ABREVIATURAS E SIGLAS

BKV – Poliomavírus BK (*Polyomavirus hominis 1*)

°C – Graus Celsius

CH – Cistite Hemorrágica

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*Desoxirribonucleic acid*)

dNTP – Desoxirribonucleótido (*Desoxirribonecleotide*)

EUA – Estados Unidos da América

IgG – Imunoglobulina do tipo G

IgM – Imunoglobulina do tipo M

INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

JCV – Poliomavírus JC (*Polyomavirus hominis 2*)

kbs – kilo bases

KIV – Poliomavírus KI

LB – *Luria-Bertani*

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

LEMP – Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva

LTA_g – *Large Tumor Antigen*

LPyV – *B-lymphotropic polyomavirus*

MCC – Carcinoma das células de Merkel (*Merkel Cell Carcinoma*)

MCV – Poliomavírus MC

ml – Mililitros

mM – Milimolar

NJ – *Neighbour-Joining*

nm – Nanómetros

nM - nanoMolar

pb – Pares de bases

PCR – Reacção de Polimerização em Cadeia (*Polimerase Chain Reaction*)

PVAN – Nefropatia Associada a Poliomavírus (*Polyomavirus-Associated Nephropathy*)

QCMD – *Quality Control for Molecular Diagnostics*

QPCR – Reacção de Polimerização em Cadeia Quantitativa em Tempo-Real (*Quantitative Real-Time Polimerase Chain Reaction*)

r² – Coeficiente de correlação

rpm – Rotações por minuto

SNC – Sistema Nervoso Central

SNPs – Polimorfismos de nucleótidos simples (*Single Nucleotide Polimorphisms*)

SPSS – *Statistical Package for the Social Science*

STAg – *Small Tumor Antigen*

TSB – *Tryptic Soy Broth*

U – Unidade

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

VP1 – Proteína Viral 1 (*Viral Protein 1*)

VP2 – Proteína Viral 2 (*Viral Protein 2*)

VP3 – Proteína Viral 3 (*Viral Protein 3*)

WUV – Poliomavírus WU

μl – Microlitros

RESUMO

A família *Polyomaviridae* é composta por vírus de pequenas dimensões que, após infectarem o hospedeiro, permanecem em estado latente. No entanto, em situações de imunossupressão, têm capacidade de induzir sintomatologia e/ou doença no hospedeiro.

O Poliomavírus JC (JCV), o Poliomavírus BK (BKV) e o Poliomavírus MC (MCV), encontram-se associados à Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva, à Nefropatia Associada a Poliomavírus e ao Carcinoma das Células de Merkel, respectivamente. Relativamente aos Poliomavírus KI (KIV) e WU (WUV), ainda não foi estabelecido um papel etiológico.

Devido à importância clínica do JCV e do BKV, bem como à necessidade de aprofundar o conhecimento sobre os novos Poliomavírus, é fundamental desenvolver e implementar metodologias sensíveis e específicas para o seu diagnóstico e caracterização molecular.

Os objectivos deste trabalho foram o desenvolvimento e a optimização de metodologias de biologia molecular, para a detecção e quantificação destes vírus, bem como a caracterização molecular dos Poliomavírus JC e BK, de forma a determinar a proporção dos diferentes tipos circulantes.

Foram desenvolvidas e validadas metodologias para a detecção do BKV (sensibilidade e especificidade de 100%), KIV, WUV e MCV e para a quantificação do JCV e do WUV (especificidade de 100% e sensibilidade na ordem das 10 cópias/ μ l). A caracterização molecular permitiu identificar, no caso do JCV, os tipos 1B, 2A, 2B, 3A e 4 e, no caso do BKV, os tipos Ib-1, Ib-2, II e IV. Os tipos mais prevalentes foram, respectivamente, o 1B (56,0%) e o II (62,5%).

O desenvolvimento e a optimização de técnicas de biologia molecular para o diagnóstico e estudo dos Poliomavírus, assumem uma relevância particular, pois são métodos de diagnóstico não invasivos e com uma sensibilidade e especificidade superiores às dos métodos convencionais, nomeadamente da imagiologia, citologia e histologia. Simultaneamente, podem ser utilizados para o estudo da etiopatologia dos novos Poliomavírus.

ABSTRACT

Polyomaviridae comprises small dimension viruses, which stay in a latent phase after primary infection. However, in immunosuppressed individuals, they are able to induce symptoms and/or disease.

JC polyomavirus (JCV), BK polyomavirus (BKV) and MC polyomavirus (MCV) are associated to Progressive Multifocal Leukoencephalopathy, to Polyomavirus-Associated Nephropathy and to Merkel Cell Carcinoma, respectively. An etiological role was not yet established for the KI and WU polyomavirus (KIV and WUV).

Due to the JCV and BKV clinical relevance, as well as the need to extend the knowledge about the new polyomaviruses, it is crucial to develop and implement specific and sensitive methodologies for their diagnosis and molecular characterization.

The main objectives of this study were the development and the optimization of methodologies for the detection and the quantification of these viruses, and the molecular characterization of JC and BK polyomaviruses.

Methodologies for the detection of BKV, which had a sensitivity and a specificity of 100%, KIV, WUV and MCV were developed and validated, as well as the quantification of JCV and WUV (specificity of 100% and sensitivity of 10 copies/ μ l). Molecular characterization allowed the identification of the JCV types 1B, 2A, 2B, 3A and 4, and the BKV types Ib-1, Ib-2, II and IV. The most prevalent types were the 1B (56,0%) and the II (62,5%), respectively.

The development and optimization of molecular methods for the polyomaviruses diagnosis and study have a particular relevance, since they are non-invasive diagnosis methods with higher sensitivity and specificity, comparing with conventional methods, like imagiology, cytology and histology. At the same time, they can be applied to etiopathogenicity studies of the new polyomaviruses.

OBJECTIVOS

Os objectivos deste trabalho foram:

a) o desenvolvimento e a optimização de metodologias de biologia molecular, para a detecção dos Poliomavírus BK, KI, WU e MC, nomeadamente, a Reacção de Polimerização em Cadeia;

b) o desenvolvimento e a optimização de metodologias de biologia molecular para a quantificação dos Poliomavírus JC, KI, WU e MC, como a Reacção de Polimerização em Cadeia Quantitativa em Tempo-Real;

c) a caracterização molecular dos Poliomavírus JC e BK.

CAPÍTULO I

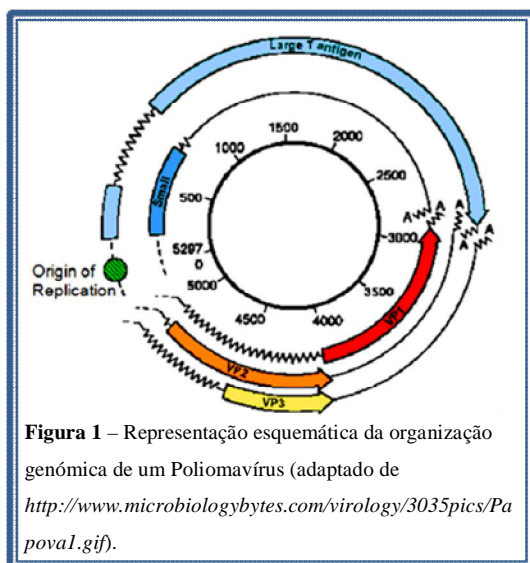
INTRODUÇÃO

1. OS POLIOMAVÍRUS

1.1. Conceitos Gerais

1.1.1. Classificação, estrutura e organização genômica

Polyomaviridae é uma família de vírus de pequenas dimensões (cerca de 40 a 45 nm de diâmetro), sem invólucro e com um genoma constituído por DNA (ácido desoxirribonucleico) circular em cadeia dupla, covalentemente fechada, que pode variar entre 4,7 – 5,4 kbs, consoante os diferentes vírus ^(1,2). As cápsides virais são constituídas por 72 pentâmeros da proteína viral 1 (VP1), estando cada um destes pentâmeros associados a uma única cópia das proteínas virais 2 (VP2) ou 3 (VP3) ^(3,4). O genoma pode ser organizado em três regiões distintas: a região reguladora, a precoce e a tardia, sendo que é nesta última que se encontram os genes que codificam as proteínas estruturais da cápside, nomeadamente a VP1, VP2 e VP3, e a agnoproteína, identificada apenas nos Poliomavírus JC (JCV) e BK (BKV) ^(5,6). Na região reguladora, não codificante, encontram-se presentes um promotor eficiente e sequências *enhancer*, essenciais à replicação dos Poliomavírus, e na região precoce encontram-se os genes que codificam o *Large Tumor Antigen* (LTAg) e o *Small Tumor Antigen* (STAg) (Figura 1) ^(5,7,8,9).



hospedeiro ⁽²⁾.

Sabe-se que os vírus desta família têm como hospedeiros naturais vários animais, tais como aves e mamíferos. Normalmente, não causam sintomatologia ou doença. No entanto, em determinadas situações, nomeadamente situações de imunossupressão, alguns Poliomavírus têm capacidade de induzir sintomatologia e/ou transformação oncogénica de diversas células ^(1,2,10). Apesar da ausência de sintomas em indivíduos saudáveis, a infecção é normalmente persistente, mantendo-se durante toda a vida do

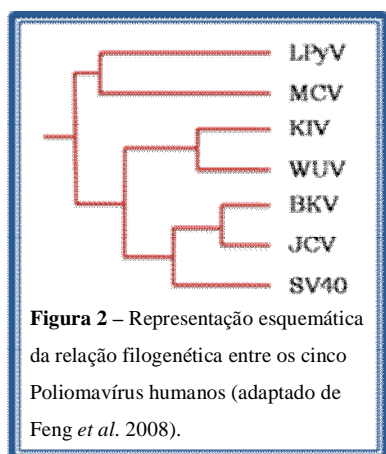
Desde 1971, foram identificados cinco Poliomavírus humanos, associados a diferentes patologias, nomeadamente, o BKV, o JCV, o KIV (Poliomavírus KI), o WUV (Poliomavírus WU) e o MCV (Poliomavírus MC) (Tabela I).

Tabela I – Poliomavírus isolados de pacientes humanos

Poliomavírus	Tamanho do Genoma (pb)	Doença Associada	Isolamento Primário
BKV	5133	Cistite Hemorrágica	Gardner <i>et al.</i> , 1971
JCV	5130	Leucoencefalopatia Progressiva Multifocal	Padgett <i>et al.</i> , 1971
KIV	5040	?	Allander <i>et al.</i> , 2007
WUV	5229	?	Gaynor <i>et al.</i> , 2007
MCV	5387	Carcinoma das Células de Merkel	Feng <i>et al.</i> , 2008

BKV, Poliomavírus BK; JCV, Poliomavírus JC; KIV, Poliomavírus KI; WUV, Poliomavírus WU; MCV, Poliomavírus MC; pb, pares de bases. Tabela adaptada de zur Hausen (2008).

De uma perspectiva filogenética, o JCV e o BKV são os mais relacionados, apresentando uma homologia de 75%, ao nível do genoma. Ambos parecem estar próximos do Poliomavírus SV40, que infecta o macaco *Rhesus* ^(2,6). Recentemente, estudos das regiões codificantes do genoma do WUV e do KIV, revelaram que estes estavam filogeneticamente

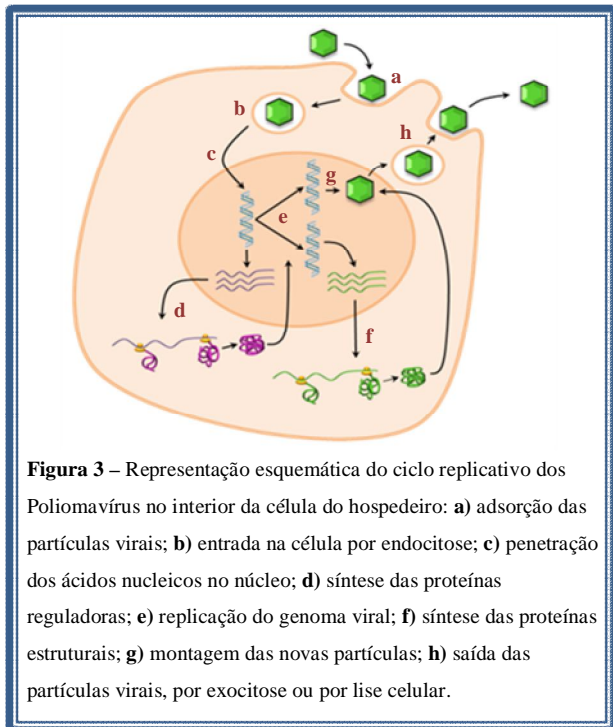


mais próximos um do outro do que dos restantes Poliomavírus humanos, o que levantou a hipótese de poderem formar um subgrupo dentro da família *Polyomaviridae* ^(7,8). Curiosamente, o MCV parece estar mais próximo do LPyV (*B-lymphotropic polyomavirus*), um Poliomavírus que infecta o macaco verde africano, podendo também ele constituir um outro subgrupo ⁽¹¹⁾ (Figura 2).

Dados epidemiológicos, virológicos e filogenéticos sugerem que estes cinco Poliomavírus humanos terão co-evoluído com o seu hospedeiro natural, o que explica a elevada prevalência da infecção, a baixa morbilidade, os longos períodos de latência e a reactivação assintomática destes vírus na população humana ⁽¹²⁾.

1.1.2. Transcrição e replicação do DNA viral

Uma vez no interior do hospedeiro, ocorre adsorção das partículas virais a receptores específicos das células-alvo (resíduos de ácido siálico de gangliosídios), reconhecidos pela VP1 (Figura 3a). Os vírus entram na célula por um processo de endocitose (Figura 3b), e o genoma viral entra no núcleo (Figura 3c). Inicia-se assim o ciclo replicativo propriamente dito, deste vírus, o qual é composto pela expressão génica precoce, a síntese de novas cópias do genoma viral e a expressão génica tardia.



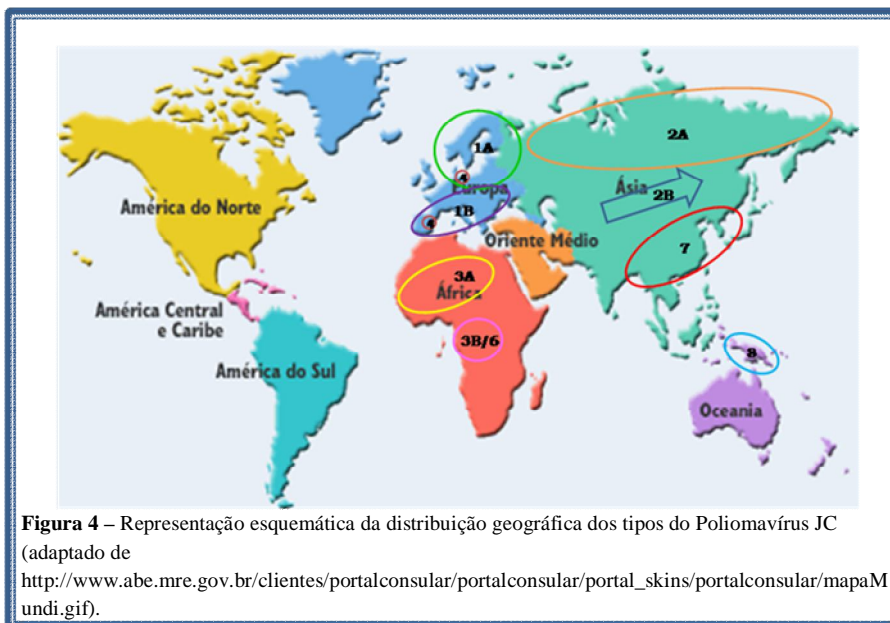
Durante a expressão precoce, são sintetizadas as proteínas LTA_g e STA_g, que vão regular todo processo de replicação viral (Figura 3d). Logo após esta fase, inicia-se a produção de novas cópias do genoma (Figura 3e), as quais vão posteriormente associar-se a nucleossomas celulares, formando estruturas designadas de “minicromossomas”^(13,14).

A expressão gênica tardia, inicia-se ainda antes de terminar a fase de síntese de cópias genômicas virais. Durante esta fase são expressas as proteínas VP1, VP2 e VP3

(Figura 3f). A montagem das novas partículas virais ocorre no interior do núcleo celular, uma vez que as proteínas estruturais dos Poliovírus têm sinais de localização nuclear (Figura 3g). As partículas virais são posteriormente libertadas por exocitose ou lise celular (Figura 3h).

1.2. O Poliovírus JC (JCV)

O JCV foi identificado pela primeira vez em 1971, por Padgett e colaboradores⁽¹⁵⁾.



Mutações silenciosas na região codificante da VP1 permitiram identificar oito tipos diferentes deste vírus (tipo 1 a 8), que parecem estar associados a regiões geográficas específicas (Figura 4)⁽¹⁶⁾.

A infecção por JCV ocorre durante a

infância, de forma subclínica. Estima-se que a prevalência mundial seja superior a 70%⁽¹⁷⁾. Após a primo-infecção, o vírus persiste no rim, de uma forma latente e assintomática, com

uma baixa patogenicidade ^(18,19). A reactivação do JCV ocorre sempre que existem alterações do sistema imunitário do hospedeiro e é acompanhada da excreção do vírus na urina. Esta excreção é também influenciada pela idade dos indivíduos, verificando-se um aumento da quantidade de partículas virais excretadas em função da idade ⁽²⁰⁾.

Nos indivíduos imunocomprometidos, após a reactivação, o JCV pode infectar outros locais anatómicos, sendo provavelmente transportado no interior das células B. Uma vez em circulação, o JCV consegue transpor a barreira hematoencefálica, atingindo o Sistema Nervoso Central (SNC) ^(21,22). Esta situação pode conduzir ao desenvolvimento da Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (LEMP), uma doença desmielinizante fatal caracterizada por uma infecção lítica dos oligodendrócitos, que afecta principalmente os indivíduos infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) ^(22,23,24,25). A morte do hospedeiro ocorre, normalmente, três a seis meses após o início dos sintomas clínicos da LEMP (extensas lesões desmielinizantes, fraqueza motora, ataxia, demência, perda de memória, deficiências cognitivas, na fala e na visão) ⁽²⁵⁾. A forma de transmissão do JCV ainda não está totalmente esclarecida. No entanto, existem três hipóteses de transmissão: por via gastrointestinal ⁽²⁶⁾, por via respiratória ^(22,27), e de pais para filhos, por co-habitação prolongada ⁽²⁸⁾.

A resposta imunitária nos indivíduos infectados por JCV é tanto humoral como celular. Nos indivíduos com diagnóstico de LEMP, são detectadas imunoglobulinas do tipo G (IgG), mas não imunoglobulinas do tipo M (IgM), o que sugere que o desenvolvimento da patologia surge na sequência de uma reactivação e não de uma infecção primária ^(27,29). No entanto, é importante referir que a infecção por JCV não induz uma resposta imunológica humoral efectiva, o que torna o seu diagnóstico serológico sem utilidade clínica. Nas lesões de LEMP são frequentemente detectados macrófagos, cuja função consiste na remoção dos produtos de mielina e oligodendrócitos danificados ⁽²²⁾. Alguns estudos demonstram que existe actividade citotóxica das células T, mesmo em situações de imunodepressão. Porém, a actividade destas células T citotóxicas parece ser ineficaz na eliminação do JCV ⁽²⁵⁾.

O diagnóstico clínico da LEMP é feito com base na observação de sintomas multifocais, e de alterações morfológicas do SNC, as quais podem ser detectadas por tomografia computadorizada, ressonância magnética, microscopia electrónica e hibridação *in situ* ⁽³⁰⁾. No entanto, como alguns dos sintomas clínicos são similares aos sintomas provocados por outros microorganismos, é importante desenvolver e implementar metodologias de biologia molecular para a detecção quantitativa e qualitativa do JCV ^(18,25,30,31).

1.3. O Poliomavírus BK (BKV)

Este vírus, foi identificado em 1971, na urina de um transplantado renal que se encontrava imunossuprimido ⁽³²⁾.

Com base em estudos serológicos e genéticos, foram identificados quatro tipos do BKV (tipo I, II, III e IV) ^(33,34). O tipo I, o mais prevalente, pode ser subdividido em Ia, Ib-1, Ib-2 e Ic ⁽³⁵⁾. Ao contrário do que acontece com o JCV, os tipos de BKV não parecem ter nenhuma distribuição geográfica específica ⁽³⁵⁾.

Estudos seroepidemiológicos apontam para uma elevada prevalência do BKV na população, na ordem dos 75 % ^(34,36). Pensa-se que a primo-infecção ocorre maioritariamente durante a infância dos indivíduos, por volta dos 5 a 10 anos de idade, com valores de seroprevalência equivalentes aos observados na idade adulta ⁽³⁴⁾. Uma vez que os sintomas associados à infecção primária por BKV são subclínicos ou semelhantes aos de gripe, o contacto inicial com o vírus encontra-se ainda muito pouco caracterizado ^(12,37). No entanto, tem sido sugerido que a transmissão do BKV ocorre por via respiratória ⁽³⁸⁾. Outras formas de transmissão como a fecal-oral ⁽³⁹⁾, a transfusional, a sexual e a transplantação, de rins em particular, foram também consideradas ⁽¹²⁾. Parece não haver transmissão mãe-filho durante a gravidez, pois o aumento de virúria que se observa na mulher, não é acompanhado de uma fase de virémia ⁽⁴⁰⁾.

Após a infecção, o BKV persiste num estado latente e assintomático, principalmente ao nível do tecido urinário do hospedeiro ^(18,41), mas tal como acontece no caso do JCV, sempre que existem alterações do sistema imunitário do hospedeiro, pode ocorrer reactivação do BKV. Nestes casos, podem surgir complicações graves, tais como a Nefropatia Associada a Poliomavírus (PVAN) ou a Cistite Hemorrágica (CH), acompanhadas de um aumento significativo da virúria ^(42,43,44). No caso dos indivíduos recém-transplantados, a reactivação do BKV pode conduzir à perda de função e/ou rejeição do transplante renal. Vários factores de risco parecem estar associados ao desenvolvimento destas patologias, mas o mais importante parece ser a elevada dose de imunossuppressores administrados após o transplante ⁽⁴⁵⁾.

Apesar da resposta imunológica do hospedeiro face à infecção por BKV ser ainda pouco estudada, sabe-se que a resposta humoral induz a produção de anticorpos neutralizantes e específicos para determinantes da VP1 ⁽³⁴⁾. No entanto, como o BKV estabelece uma infecção latente, a presença destes anticorpos não é indicativa de uma possível reactivação, mas apenas de infecção. Assim, e dada a elevada prevalência do BKV na população, o diagnóstico serológico não tem interesse clínico. Relativamente à imunidade celular, pensa-se que esta

deve desempenhar um papel importante no controlo da infecção pelo BKV, uma vez que a virúria tende a aumentar nas situações de infecção por VIH, transplantação ou quimioterapia⁽¹²⁾.

Uma forma de diagnóstico do BKV é a observação citológica das alterações morfológicas induzidas por este vírus nas células presentes na urina de indivíduos com PVAN⁽¹²⁾. Contudo, a sensibilidade deste método é muito inferior à sensibilidade dos métodos de biologia molecular, aplicados ao diagnóstico do BKV no soro, no plasma ou na urina, que começam a surgir⁽³⁷⁾.

1.4. O Poliomavírus KI (KIV)

O KIV foi identificado em 2007, em exsudados nasofaríngeos de três indivíduos com sintomas de infecção respiratória aguda, o que levantou a hipótese de este ser um vírus do foro respiratório⁽⁷⁾. Neste estudo desenvolvido por Allander e colaboradores (2007), o KIV foi identificado em 1% (6/637) dos indivíduos estudados. No entanto, em cinco dos seis casos positivos, foram igualmente identificados outros vírus respiratórios, pelo que não foi possível associar a sintomatologia clínica à infecção por KIV. Estes resultados foram semelhantes aos observados num estudo posterior, cujo objectivo era estabelecer uma associação entre a infecção pelo KIV e doenças respiratórias agudas do tracto respiratório superior e inferior⁽¹⁾. Neste estudo, para além dos exsudados nasofaríngeos, foram também utilizadas amostras fecais, uma vez que alguns vírus respiratórios são eliminados nas fezes. Das 192 amostras fecais estudadas, apenas uma foi positiva para o KIV⁽⁷⁾. Estudos posteriores revelaram que a prevalência de infecção por este Poliomavírus é de cerca de 0,5% – 1,2% em amostras pediátricas, podendo ser inferior, ou até mesmo nula, em indivíduos adultos imunocompetentes^(46,47).

O KIV parece apresentar uma vasta distribuição geográfica, tendo sido já identificado em diversos países^(48,49,50,51,52).

A forma de transmissão do KIV e a resposta imunológica do hospedeiro são ainda desconhecidas. No entanto, e devido à presença deste vírus em produtos biológicos do aparelho respiratório, é possível que a transmissão ocorra por via respiratória⁽⁷⁾.

Por se tratar de um vírus identificado recentemente, existe necessidade de se desenvolverem formas de diagnóstico, baseadas em técnicas de biologia molecular, tais como a Reacção de Polimerização em Cadeia (PCR) ou a PCR Quantitativa em Tempo-Real (QPCR).

1.5. O Poliomavírus WU (WUV)

Em 2007, Gaynor e colaboradores identificaram um outro Poliomavírus humano, o WUV, no exsudado nasofaríngeo de uma criança de 3 anos de idade com doença respiratória aguda de etiologia desconhecida. Este grupo realizou um estudo de prevalência do WUV, em dois grupos geográficos distintos ⁽⁸⁾. Na Austrália, a prevalência em indivíduos com idades entre os 4 meses e os 53 anos foi de 3% (37/1245), dos quais 89% (33/37) foram identificados em crianças com idade igual ou inferior a 3 anos. Em 12 indivíduos com manifestações claras de infecção respiratória, o WUV foi o único vírus detectado. Nos Estados Unidos da América (EUA), o estudo incluiu indivíduos com idades compreendidas entre os 4 meses e os 51 anos e a prevalência foi de 0,7% (6/890). É de referir que, os adultos em que foi identificado o WUV, em ambos os grupos, se encontravam imunocomprometidos ⁽⁸⁾. No entanto, os dados obtidos neste e em estudos posteriores, não permitiram estabelecer uma relação causal entre a presença do WUV e a doença respiratória, nem a outras doenças como a gastroenterite, uma vez que, também o WUV havia já sido detectado em amostras fecais ^(1,47,53,54).

O WUV parece apresentar uma ampla distribuição geográfica e uma prevalência variável de região para região ^(48,50,53,55,56,57).

É ainda desconhecida a forma de transmissão do WUV, mas tal como observado para o KIV, a presença do vírus em produtos biológicos do sistema respiratório, parece indicar uma transmissão por via respiratória ^(8,48). Relativamente à resposta imunológica do hospedeiro, esta é ainda desconhecida.

O desenvolvimento de metodologias sensíveis e específicas, na área da biologia molecular, é essencial para a identificação e o esclarecimento do papel etiológico do WUV.

1.6. O Poliomavírus MC (MCV)

Em 2008, foi identificado um novo Poliomavírus, o MCV, o qual parece estar associado ao desenvolvimento do Carcinoma das Células de Merkel (MCC). O MCC é um tumor cutâneo neuroendócrino, muito agressivo e raro, que afecta maioritariamente indivíduos acima dos 55 anos de idade e imunocomprometidos (seropositivos para o VIH, recém-transplantados e pacientes com tumores das células B) ⁽¹¹⁾. Nestes indivíduos, a mortalidade por MCC pode atingir os 56,0% ⁽⁵⁸⁾.

Num estudo realizado por Feng e colaboradores (2008), foi detectada a presença do MCV em 80,0% (8/10) dos casos de MCC. Na maioria destes (6/8), foi observado um padrão de integração clonal, o que pode explicar a transformação maligna das células infectadas.

Tal como no caso do KIV e do WUV, desconhece-se a forma de transmissão do MCV e qual a resposta imunológica do hospedeiro. No entanto, este vírus já foi identificado em secreções respiratórias ^(59,60).

Actualmente, o diagnóstico clínico do MCC é feito com base na observação histológica.



Algumas das características deste tipo de tumor são o crescimento exterior em forma de cúpula, o crescimento em forma de *iceberg*, com invasão da derme, e as ulcerações, presentes apenas nos estádios mais avançados ⁽⁵⁸⁾ (Figura 5).

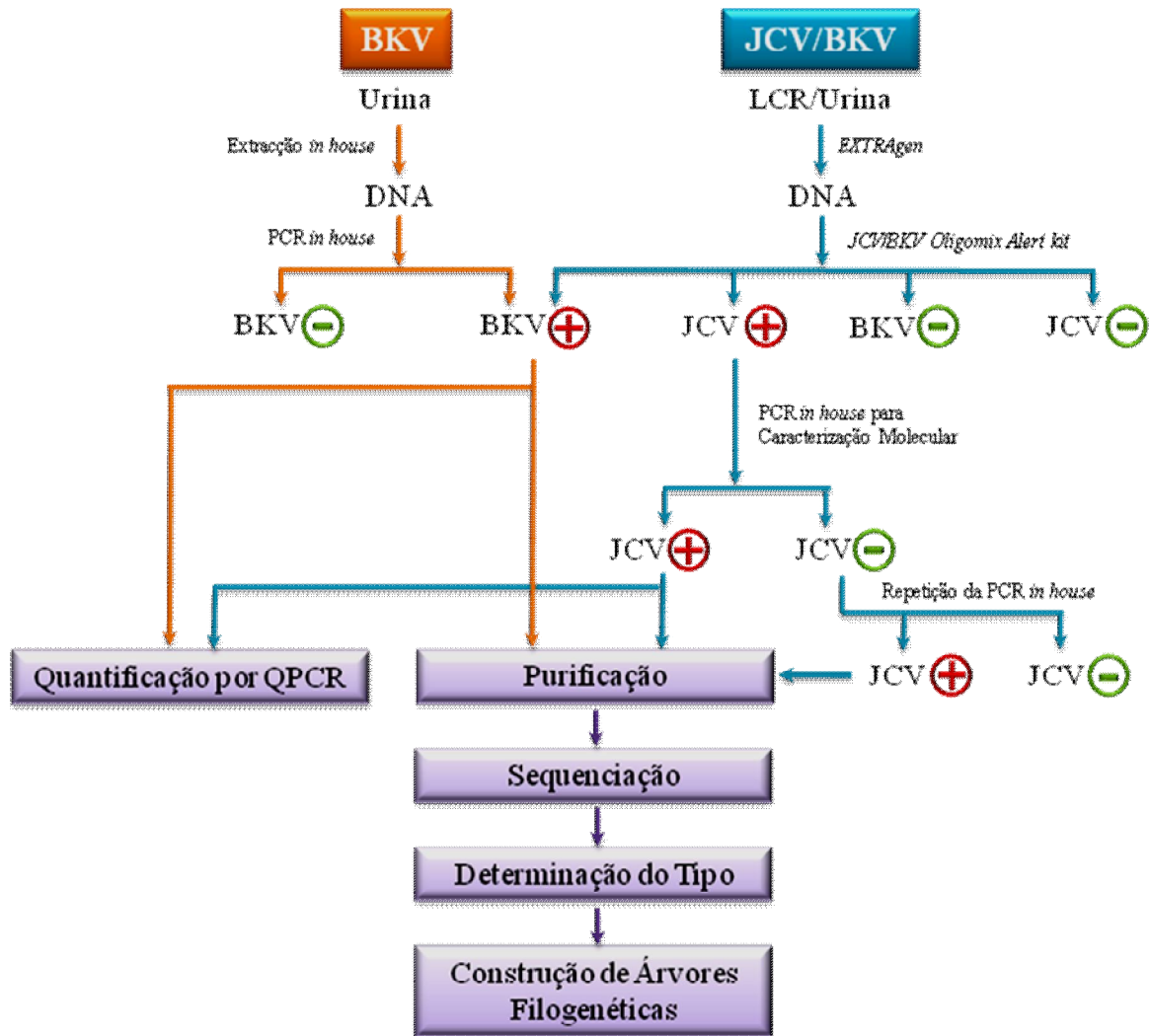
Sendo o MCC uma doença grave e com uma elevada taxa de mortalidade, o diagnóstico precoce da infecção por MCV, poderá passar pelo desenvolvimento de técnicas de biologia molecular.

CAPÍTULO II

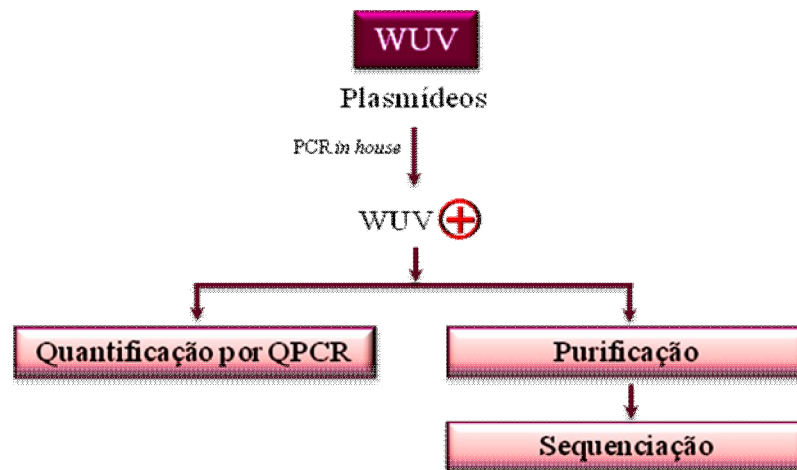
MATERIAIS E MÉTODOS

1. PLANOS DO TRABALHO EXPERIMENTAL

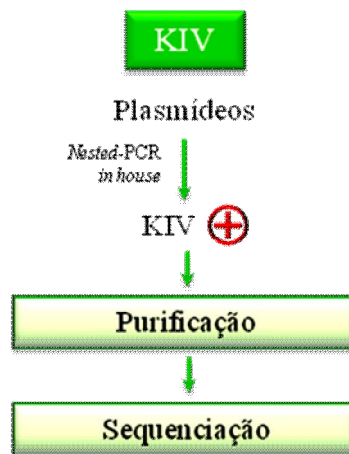
1.1. Estudo dos Poliomavírus BK e JC



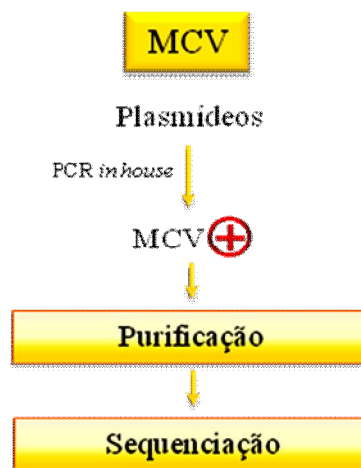
1.2. Estudo do Poliomavírus WU



1.3. Estudo do Poliomavírus KI



1.4. Estudo do Poliomavírus MC



2. DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS DE DETECÇÃO QUALITATIVA DOS POLIOMAVÍRUS BK, KI, WU E MC

Uma vez que já existem sistemas comerciais apropriados para o diagnóstico do JCV (*JCV/BKV Oligomix Alert kit*, Nanogen, EUA), os métodos de detecção qualitativa desenvolvidos neste trabalho apenas dizem respeito aos restantes Poliomavírus, nomeadamente, ao BKV, ao KIV, ao WUV e ao MCV.

2.1. Produtos Biológicos

A detecção dos Poliomavírus humanos foi realizada em diferentes produtos biológicos, uma vez que estes vírus estão associados a diferentes patologias. Assim, para o diagnóstico do JCV, foi utilizado líquido cefalorraquidiano (LCR) e para o diagnóstico do BKV foi utilizada urina. Para o desenvolvimento das técnicas de detecção do KIV, do WUV e do MCV, foram utilizados plasmídeos, amavelmente cedidos pelos grupos de investigação de Allander ⁽⁷⁾, Gaynor ⁽⁸⁾ e Foulongne ⁽⁶¹⁾, respectivamente. Devido a limitações de tempo, não foi possível obter exsudados nasofaríngeos para a detecção do KIV e do WUV, nem biopsias de casos de MCC para a detecção do MCV.

2.2. Extração do DNA

Para a extração do DNA no LCR, foi utilizado o sistema comercial *EXTRAGEN* (Nanogen, EUA), segundo as instruções do fabricante (http://www.nanogenad.net/pdf/ENG/Extg01_00_en.pdf).

Na extração do DNA na urina, foi utilizado um protocolo de extração *in house* adaptado de Jin e colaboradores ⁽³³⁾. Resumidamente, foi centrifugado 1 ml de urina a 10 000 rpm, durante 2 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 1 ml de soro fisiológico e a suspensão obtida foi centrifugada a 10 000 rpm, durante 2 minutos. Foram utilizados 100 µl de água bidestilada esterilizada para ressuspenso o sedimento obtido e a suspensão foi aquecida durante 5 minutos a 95°C. Finalmente, foi realizada uma breve centrifugação de 10 segundos e o DNA extraído foi guardado a -80°C.

2.3. Sequências de Primers

Para a detecção do BKV, do KIV, do WUV e do MCV foram utilizados os pares de *primers* indicados na Tabela II. Relativamente ao KIV, encontram-se indicados dois pares de *primers*, uma vez que este foi amplificado por *nested-PCR*.

Tabela II- Sequências de *primers* utilizados nas PCR dos Poliomavírus BK, do KI, do WU e do MC

Poliomavírus	<i>Primers</i>	Sequências dos <i>Primers</i> (5' → 3')	Região	Tamanho do Fragmento (pb)	Publicação
BKV	BK_VPIF	CAAGTGCCAAAACACTACTAAT	VP1	327	Jin <i>et al.</i> , 1993
	BK_VPIR	TGCATGAAGGTTAAGCATGC			
KIV	POLVP1-39F	AAGGCCAAGAAGTCAAGTTC	VP1	325	Allander <i>et al.</i> , 2007
	POLVP1-363R	ACACTCACTAACTTGATTTGG			
	POLVP1-118F	GTACCACTGTCAGAAGAAAC		207	
	POLVP1-324R	TTCTGCCAGGCTGTAACATAC			
WUV	AG0044	TGTTACAAATAGCTGCAGGTCAA	VP2	250	Gaynor <i>et al.</i> , 2007
	AG0045	GCTGCATAATGGGGAGTACC			
MCV	LT3F	TTGTCTCGCCAGCATTGTAG	LTA _g	309	Feng <i>et al.</i> , 2008
	LT3R	ATATAGGGGCTCGTCAACC			

As sequências dos *primers* foram alinhadas com as sequências genómicas dos respectivos vírus, através do programa MEGA, versão 3.1 ⁽⁶²⁾, para confirmar o emparelhamento correcto com a região pretendida. As quatro sequências genómicas foram retiradas do GenBank (números de acesso: NC_001538 para o BKV, NC_009238 para o KIV, NC_009539 para o WUV e NC_010277 para o MCV). Foi ainda verificado se os *primers* não emparelhavam com outras sequências genómicas, através do programa *Fasta 33* (EMBL-EBI).

2.4. Optimização da PCR

Na optimização das técnicas de PCR dos Poliomavírus, foram utilizados sempre os mesmos DNA, previamente extraídos, de modo a garantir que eventuais diferenças na amplificação não estavam relacionadas com a qualidade ou a quantidade de DNA presente.

Para a detecção do BKV na urina, foi testada uma adaptação do protocolo descrito por Jin e colaboradores ⁽³³⁾. Para os Poliomavírus KI, WU e MC, foram utilizadas adaptações dos protocolos descritos por Allander e colaboradores ⁽⁷⁾, Gaynor e colaboradores ⁽⁸⁾ e Feng e colaboradores ⁽¹¹⁾, respectivamente. Os plasmídeos, com o genoma do KIV, WUV e MCV clonado, foram utilizados directamente nas reacções de amplificação. É de referir que, uma vez que o DNA do WUV foi recebido em papel *Whatman*, a primeira reacção foi preparada utilizando um sistema comercial apropriado para amplificações de DNA conservados desta forma, o *KAPA Blood PCR Kit* (Kapa Biosystems, EUA), segundo as instruções do fabricante (http://www.kapabiosystems.com/public/pdfs/kapa-blood-pcr-kits/KAPA_Blood_TDS.pdf). Este produto de PCR foi então utilizado como DNA *template* para os ensaios de optimização da PCR do WUV.

De forma a determinar qual a concentração ideal dos reagentes críticos da PCR, foram utilizadas duas concentrações diferentes de MgCl₂ (2,5 mM e 1,5 mM) e de polimerase (2,5 U e 1,5 U) (*AmpliTaQGold*, Applied Biosystems, EUA). A mistura de reacção para o BKV, o KIV, o WUV e o MCV foi preparada de acordo com as condições descritas na Tabela III. Em

todas as reacções foi utilizada água bidestilada esterilizada (SIGMA), para perfazer o volume final de 50 µL.

Tabela III – Condições das PCR e respectivos perfis de amplificação dos Poliomavírus BK, KI, WU e MC

Poliomavírus	Condições da Reacção de Amplificação		Perfis de Amplificação
	Reagentes	Concentração/Volume na Reacção	
BKV	Tampão de Reacção	1X	95°C, 10 minutos
	Cada dNTP	0,4 mM	95°C, 1 minuto
	BK_VP1F	0,4 µM	57°C, 1 minuto
	BK_VP1R	0,4 µM	72°C, 1 minuto
	DNA	5 µL	72°C, 10 minutos
KIV (1ª Reacção)	Tampão de Reacção	1X	95°C, 10 minutos 95°C, 30 segundos 63°C, 30 segundos 72°C, 1 minuto 72°C, 10 minutos
	Cada dNTP	0,4 mM	
	POLVP1-39F	0,4 µM	
	POLVP1-363R	0,4 µM	
	DNA	5 µL	
KIV (2ª Reacção)	Tampão de Reacção	1X	63°C, 30 segundos 72°C, 1 minuto 72°C, 10 minutos
	Cada dNTP	0,4 mM	
	POLVP1-118F	0,4 µM	
	POLVP1-324R	0,4 µM	
	DNA	1 µL	
WUV	Tampão de Reacção	1X	95°C, 10 minutos
	Cada dNTP	0,4 mM	95°C, 1 minuto
	AG0044	0,5 µM	57°C, 1 minuto
	AG0045	0,5 µM	72°C, 1 minuto
	DNA (produto de PCR)	2 µL	72°C, 10 minutos
MCV	Tampão de Reacção	1X	95°C, 10 minutos
	Cada dNTP	0,4 mM	95°C, 30 segundos
	LT3F	0,3 µM	61°C, 30 seg. (10x); 59°C, 30 seg. (10x); 57°C, 30 seg. (15x)
	LT3R	0,3 µM	72°C, 1 minuto
	DNA	5 µL	72°C, 10 minutos

2.5. Análise em Gel de Agarose

Os produtos da PCR foram aplicados num gel de agarose a 2,5% (SeaKem® LE Agarose, Lonza, Suíça), e foram visualizados com o auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta, após coloração com *GelRed*. O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com o marcador de peso molecular VIII (Roche, Suíça).

2.6. Purificação dos Produtos da PCR

Para a purificação dos produtos amplificados foi utilizado o sistema comercial *JETquick Spin Column Technique PCR Purification* (Genomed, EUA), de acordo com as instruções do fabricante (http://www.genycell.com/images/productos/protocolos/400050__.pdf), mas com uma alteração, nomeadamente, diminuição do volume de eluição dos produtos amplificados.

2.7. Reacção de Sequenciação

Cada reacção de sequenciação foi preparada segundo as condições descritas na Tabela IV.

Tabela IV – Condições da reacção de sequenciação e perfil de amplificação dos Poliomavírus BK, KI, WU e MC

Reagentes	Volume na Reacção	Perfil de Amplificação
<i>BigDye</i>	0.5 µl	25x 96°C, 10 segundos 50°C, 5 segundos 60°C, 4 minutos 12°C, ∞
Tampão do <i>BigDye</i>	3.5 µl	
<i>Primer</i>	1 µl	
Produto de PCR	X µl	
H ₂ O (SIGMA)	X µl	
Volume Total de Reacção	10 µl	

A quantidade de produto amplificado, utilizado em cada reacção de sequenciação, variou (entre 1 - 5 µl), consoante a intensidade da banda observada no gel de agarose anteriormente realizado.

2.8. Análise de Sequências

A leitura das sequências foi realizada pelo sequenciador automático *ABI PRISM® 7000 Detection System* e a análise foi efectuada através do programa *Chromas Life*, versão 2.0.

3. DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS DE DETECÇÃO QUANTITATIVA DOS POLIOMAVÍRUS JC E WU E QUANTIFICAÇÃO DOS POLIOMAVÍRUS JC E BK

Não foi necessário desenvolver a QPCR para a quantificação do BKV, uma vez que, foi utilizado um sistema comercial. É também de referir que, devido a limitações de tempo, não foi possível desenvolver a QPCR do KIV e do MCV.

3.1. Produtos Biológicos

Os produtos biológicos utilizados foram os descritos no ponto 2.1.

3.2. Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada de acordo com o descrito no ponto 2.2.

3.3. Sequências de *Primers* e de Sondas *TaqMan®*

Para a quantificação *in house* do JCV e do WUV foram utilizados pares de *primers* e sondas *TaqMan®* específicos de regiões conservadas destes vírus (Tabela V).

Tabela V – Sequências de *primers* e sondas utilizadas na QPCR dos Poliomavírus JC e WU

Poliomavírus	Oligonucleótidos	Sequências Nucleotídicas (5' → 3')	Região	Tamanho do Fragmento (pb)	Publicação
JCV	JCV_LTA _g _F	TTCTTCATGGCAAACAGGTCTT	LTA _g	66	McNees <i>et al.</i> , 2005
	JCV_LTA _g _R	GAATGGGAATCCTGGTGAA			
	Sonda	CCACTTCTCATTAATG			
WUV	WU-B-2729-F	CTACTGTA AATTGATCTATTGCAACTCCTA	LTA _g	136	Bialasiewicz <i>et al.</i> , 2007
	WU-B-2808-R	GGGCTATAAACAGTGGTAAAACAACACT			
	Sonda	TGCCATACCAACACAGCTGCTGAGC			

Foi realizado um alinhamento entre as sequências genómicas destes vírus e as dos oligonucleótidos, através do programa MEGA, versão 3.1 ⁽⁶²⁾, para garantir o correcto emparelhamento. As sequências genómicas utilizadas neste alinhamento encontram-se depositadas no GenBank com os seguintes números de acesso: NC_001699 (JCV) e NC_009539 (WUV). Através do programa *Fasta 33* (EMBL-EBI), foi também confirmado se os *primers* e as sondas não emparelhavam com outras sequências genómicas

3.4. Preparação de Calibradores

Um calibrador é uma suspensão, de um determinado ácido nucleico, cuja concentração é conhecida, o que permite aos utilizadores da QPCR construir uma recta de calibração para a quantificação de um outro ácido nucleico. Para a validação, optimização da amplificação e posterior determinação da carga viral dos casos estudados, foi necessário construir, para cada vírus e em cada reacção, uma recta de calibração.

Para o JCV e para o WUV, foram utilizados plasmídeos, com uma única cópia da região genómica de interesse clonada (gene da LTA_g). O procedimento utilizado encontra-se descrito no Anexo 1.

3.5. Optimização da QPCR

Para a optimização da QPCR, foram utilizados sempre os mesmos calibradores, de modo a garantir que a existência de possíveis diferenças de amplificação e quantificação não estariam relacionadas com a qualidade ou a quantidade de DNA em estudo. Os procedimentos de quantificação do JCV e do WUV, foram adaptados de McNees e colaboradores ⁽⁶³⁾ e de Bialasiewicz e colaboradores ⁽⁶⁴⁾, respectivamente (Tabela VI).

Tabela VI – Condições da QPCR e perfil de amplificação dos Poliomavírus JC e WU

Condições de Reacção		Condições de Amplificação
Reagentes	Concentração/Volume na Reacção	
TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA)	12,5 µl	50x
Sonda	100 nM	
Cada <i>Primer</i>	900 nM	
DNA	5 µl	
H ₂ O	4,5 µl	
Volume Total		25 µl

3.6. Quantificação dos Poliomavírus JC e BK

No caso do JCV, em cada reacção da QPCR, os calibradores foram colocados em triplicado e as amostras em duplicado. Foram igualmente incluídos controlos negativos.

Para a quantificação do BKV, foi utilizado o sistema comercial *BKV Q-PCR Alert Kit* (Nanogen, EUA), em conjunto com o respectivo sistema comercial de calibradores *BKVQ-*

PCR Standards (Nanogen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante (http://www.nanogenad.net/pdf/ENG/RTS175_00_en.pdf e <http://www.nanogenad.net/pdf/ENG/STD175.pdf>). Tal como descrito anteriormente, os calibradores foram testados em triplicado, as amostras em duplicado e foram incluídos controlos negativos.

3.7. Análise Estatística

Foi utilizado o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 16.0, através do qual se aplicaram os testes *Shapiro-Wilk*, para verificar se a amostra estudada apresentava ou não uma distribuição normal, e *Wilcoxon Signed Ranks*, teste não-paramétrico, para estudar a variância entre amostras dependentes.

4. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS POLIOMAVÍRUS JC E BK

4.1. Produtos Biológicos

Os produtos biológicos utilizados na caracterização molecular do JCV e do BKV encontram-se referidos no ponto 2.1.

4.2. Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada de acordo com o descrito no ponto 2.2.

4.3. PCR para a Caracterização Molecular

Para a PCR de caracterização molecular do JCV, foi utilizado o sistema de *primers* (Tabela VII) e as condições de reacção já implementadas no laboratório (Tabela VIII).

Tabela VII – *Primers* para a caracterização molecular do Poliomavírus JC

Poliomavírus	<i>Primers</i>	Sequência dos <i>Primers</i> (5' → 3')	Região	Tamanho do Fragmento (pb)	Publicação
JCV	JLP15	ACAGTGTGGCCAGAATTCCACTACC	VP1	215	Frisque <i>et al.</i> , 1984
	JLP16	TTTCTGTTGGGGGGGAGGCTTA			

Tabela VIII – Condições da PCR e perfil de amplificação do Poliomavírus JC

Poliomavírus	Condições da Reacção de Amplificação		Perfil de Amplificação
	Reagentes	Concentração/Volume na Reacção	
JCV	Tampão	1 X	50 x 95°C, 9 minutos 95°C, 30 segundos 63°C, 30 segundos 72°C, 30 segundos 72°C, 10 minutos 12°C, ∞
	Cada dNTP	0,4 mM	
	MgCl ₂	2,5 mM	
	JLP15	0,5 mM	
	JLP16	0,5 mM	
	<i>AmpliTaqGold</i>	1 U	
	DNA	5 µl	
	H ₂ O	Até prefazer 50 µl de reacção	

Para a PCR de caracterização molecular do BKV, foram utilizados os *primers* indicados no ponto 2.3. e as condições otimizadas no ponto 2.4.

4.4. Análise em Gel de Agarose

A análise dos produtos amplificados foi realizada segundo o descrito no ponto 2.5.

4.5. Purificação dos Produtos da PCR

A purificação dos produtos da PCR foi realizada como indicado no ponto 2.6.

4.6. Reacção de Sequenciação

Os produtos da PCR foram sequenciados segundo as condições descritas no ponto 2.7.

4.7. Análise de Sequências

A leitura e a análise das sequências foram efectuadas de acordo com o descrito no ponto 2.8. Através da identificação dos polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs - *Single Nucleotide Polymorphisms*), característicos de cada tipo, foi possível proceder à caracterização molecular do JCV (Tabela IX) e o BKV (Tabela X), presentes nos casos estudados. A numeração dos nucleótidos foi baseada no protótipo *Mad-1* (JCV), segundo Frisque e colaboradores ⁽⁶⁵⁾, e na sequência de referência do BKV, a *Dunlop* ⁽⁶⁶⁾.

Tabela IX – Grelha para a caracterização molecular do Poliomavírus JC

	Posição dos SNPs															
	1753	1756	1771	1786	1790	1795	1804	1805	1813	1816	1818	1837	1843	1850	1869	1870
Tipo 1A	A	C	C	G	T	A	T	A	G	A	G	T	G	A	G	G
Tipo 1B	A	C	C	G	T	A	T	A	G	A	G	T	T	G	G	G
Tipo 2A	A	C	A	G/T	T	A	T	A	A/G	A	C	T	T	A	G	A
Tipo 2B	A	C	A	T	T	A	T	A	G	A	C	C	T	G	G	A
Tipo 2C	A	C	A	T	T	A	T	A	G	A	C	T	T	G	G	A
Tipo 3A	T	C	A	A	T	A	C	A	G	A	C	T	T	A	C	A
Tipo 3B	T	C	A	G	T	A	T	A	G	A	C	T	T	A	?	G
Tipo 4	A	C	A	G	T	A	T	A	G	A	C	T	G	A	C	A
Tipo 6	A	C	C	G	C	A	T	A	G	A	C	T	T	A	G	G
Tipo 7A	A	T	A	G	T	A	T	T	G	A/G	C	T	T	A	G	A
Tipo 7B	A	C	A	G	T	A	T	A	G	A	C	T	T	A	G	A
Tipo 7C	A	C	A	G	T	G	T	T	G	A	C	T	T	A	G	A

Tabela X – Grelha para a caracterização molecular do Poliomavírus BK

	Posição dos SNPs																	
	1744	1746	1747	1760	1766	1767	1768	1769	1770	1775	1784	1787	1792	1793	1794	1803	1809	1811
Tipo I	G	A	A	T	T	A	A	A	G	G	A	A	A	G	C	C/T	G/A/C	G
Tipo II	G	T	A	A	T	A	A	A	G	C	A	C	G	A	C	C	C	A
Tipo III	G	T	A	A	A	G	C	A	C	G	A	C	G	A	G	C	C	G
Tipo IV	A	T	G	A	T	A	A	G	A	C	C	C	G	A	C/G	C	C	G

Para a classificação dos subtipos que compõem o tipo I do BKV foi necessário recorrer a uma segunda grelha de caracterização molecular (Tabela XI).

Tabela XI – Grelha para a determinação dos subtipos do tipo I do Poliomavírus BK

	Posição dos SNPs				
	1809	1860	1887	1908	1923
Subtipo Ia	G	A	A	T	T
Subtipo Ib-1	A	A	A	T	C
Subtipo Ib-2	A/C	A	A	A	C
Subtipo Ic	G	G	C/A	T	T

4.8. Análise Filogenética

Para a análise filogenética do JCV e do BKV, foi utilizado o programa MEGA versão 3.1⁽⁶²⁾. As sequências obtidas foram alinhadas através do programa *ClustalW*, utilizando a opção de múltiplos alinhamentos, e comparadas com as sequências de referência de cada tipo do JCV e do BKV.

Através da análise da matriz de diferenças de nucleótidos, foi possível verificar o número de nucleótidos que diferiam entre cada duas sequências. Foram definidos os grupos de sequências de acordo com os tipos identificados e, utilizando o método *Neighbour-Joining* (NJ), foi construída a árvore filogenética, com todas as topologias possíveis⁽⁶²⁾. Para inferir a fiabilidade da árvore construída, foi incluído o teste de filogenia de *bootstrap*⁽⁶⁷⁾, que compara as n árvores filogenéticas construídas com a árvore consenso (a que reúne a melhor relação filogenética), consoante o número de replicados definidos (geralmente 1000 - n). O número de vezes que surge o mesmo ramo é expresso em percentagem, sendo que valores acima dos 50% demonstram que a topologia da árvore está correcta. Foi também utilizado o algoritmo *p-distance* que calcula a proporção p de cada nucleótido ser diferente, em cada duas sequências comparadas. Obtém-se através da divisão do número de diferenças de nucleótidos pelo número total de sequências comparadas⁽⁶²⁾.

CAPÍTULO III

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS DE DETECÇÃO QUALITATIVA DOS POLIOMAVÍRUS BK, KI, WU E MC

1.1. Sequências de *primers*

A análise dos alinhamentos, entre as sequências dos diferentes pares de *primers* e as sequências de referência dos quatro Poliovírus estudados, permitiu constatar que houve um emparelhamento correcto. Os resultados obtidos através do programa *FASTA33* (EMBL-EBI) foram indicativos de que estes oligonucleótidos não amplificam outras regiões. Assim, estes foram os *primers* utilizados nas PCR a implementar.

1.2. Optimização da PCR

Foi possível amplificar a região de interesse do BKV, do KIV, do WUV e do MCV, através das PCR avaliadas (Anexo 5, Figura 6), mas com diferenças, consoante as condições utilizadas.

Relativamente ao BKV, o resultado que parece ser indicativo de uma amplificação mais eficiente foi o obtido com 1,5 mM de MgCl₂ e 1,5 U de *AmpliTaqGold* (Anexo 5, Figura 6a, coluna 4), provavelmente porque nesta concentração o MgCl₂ não chegou a ser um factor limitante. Esta foi a condição escolhida para as amplificações posteriores. Uma vez que, para o BKV estavam disponíveis alguns produtos dos painéis de avaliação externa de qualidade do JCV e BKV (*Quality Control for Molecular Diagnostics JC Virus and BK Virus DNA EQA Programme – QCMD*) de 2008 e 2009, foi possível testar e validar as condições optimizadas (Tabela XII).

Tabela XII – Resultados da detecção qualitativa do Poliovírus BK

		QCMD 2008 e 2009		
		+	-	
PCR in house	+	11	0	11
	-	0	13	13
		11	13	24

QCMD, *Quality Control for Molecular Diagnostics*; PCR, Reacção de Polimerização em Cadeia

Como se pode verificar, a PCR optimizada revelou uma sensibilidade e uma especificidade de 100% (Tabela XII), o que permitiu considerar esta metodologia como adequada ao diagnóstico da infecção por BKV.

Os resultados obtidos na optimização da PCR do KIV foram, independentemente das condições utilizadas, muito semelhantes entre si (Anexo 5, Figura 6b, colunas 1 a 4 e 5 a 8), parecendo indicar uma boa amplificação do DNA deste vírus. Assim, e de acordo com o observado optou-se pela utilização de 1,5 mM de MgCl₂ e 1,5 U de *AmpliTaqGold*.

No caso do MCV (Anexo 5, Figura 6c), a concentração de MgCl₂ influenciou de forma significativa os resultados (colunas 1 e 2 comparativamente com as colunas 3 e 4), enquanto que a concentração do enzima apenas influenciou os resultados quando foi utilizada com concentrações mais baixas de MgCl₂ (colunas 3 e 4). De facto, a adição de mais enzima (coluna 3) não originou uma amplificação mais eficiente do que a que foi obtida com menor quantidade de enzima (coluna 4). De acordo com o observado, a utilização de 2,5 mM de MgCl₂ e de 1,5 U de *AmpliTaqGold*, foi considerada como a mais eficiente para a detecção do MCV (coluna 2).

Relativamente ao WUV, observou-se que foram obtidas amplificações mais eficientes quando se utilizaram concentrações mais elevadas de MgCl₂ (Anexo 5, Figura 6d, colunas 1 e 2). A concentração do enzima não pareceu alterar o rendimento da amplificação (colunas 1 e 2 ou 3 e 4). Assim, a utilização de 2,5 mM de MgCl₂ e de 1,5 U de *AmpliTaqGold* foi considerada a mais adequada para a detecção do WUV.

No entanto, convém referir que no caso do KIV, do WUV e do MCV as PCR foram testadas e optimizadas utilizando como *template* DNA plasmídico, pelo que a aplicação destas metodologias a DNA celulares, extraídos de produtos biológicos humanos, terá que ser avaliada.

1.3. Sequenciação

A sequenciação dos produtos amplificados, mostrou que, de facto, os fragmentos em análise foram os esperados, o que permite, com alguma segurança, comprovar que as condições optimizadas são as adequadas para o diagnóstico da infecção por BKV, KIV, WUV e MCV.

2. DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS DE DETECÇÃO QUANTITATIVA DOS POLIOMAVÍRUS JC E WU E QUANTIFICAÇÃO DOS POLIOMAVÍRUS JC E BK

2.1. Sequências de *primers* e sondas *TaqMan*[®]

Pela análise dos alinhamentos realizados entre as sequências genómicas do JCV e do WUV e as sequências dos respectivos oligonucleótidos, foi possível comprovar que os emparelhamentos eram totais. Também para estes oligonucleótidos foi possível verificar, através do programa *Fasta33* (EMBL-EBI), que não ocorria emparelhamento com outras sequências.

2.2. Optimização da QPCR

Da realização dos ensaios iniciais da QPCR, utilizando os calibradores do JCV e do WUV, foi possível verificar que as condições avaliadas foram adequadas à obtenção de reacções com eficiências de amplificação próximas dos 100%. Este valor foi determinado através da análise das rectas de calibração construídas (Anexo 6, Figuras 7 e 8), caracterizadas por declives próximos de -3,2 (-3,39 para o JCV e -3,4 para o WUV) e por coeficientes de correlação (r^2) próximos de 1 (0,98 para o JCV e 0,99 para o WUV). No entanto, foi necessário aumentar o número de ciclos da QPCR, de 40 para 50 ciclos, uma vez que as soluções calibradoras com concentrações mais baixas, apenas começavam a ser detectadas após o 35º ciclo. Esta condição inicial poderia condicionar a detecção do JCV e do WUV nos casos de cargas virais mais baixas, dando origem a resultados falsos negativos. Nem sempre foi possível quantificar os calibradores na concentração de 1 cópia/ μ l. Desta forma, a sensibilidade de ambas as QPCR foi considerada como sendo a correspondente à maior diluição amplificada em todos os ensaios, nomeadamente 10 cópia/ μ l, o que está de acordo com o descrito na literatura ⁽⁶⁾.

Relativamente ao JCV, uma vez que estavam disponíveis 12 produtos do painel QCMD de 2008, foi possível avaliar a especificidade e confirmar a sensibilidade da QPCR desenvolvida (Tabelas XIII e XIV).

Tabela XIII – Comparação dos resultados da QPCR *in house* do Poliovírus JC com o painel de avaliação externa de qualidade QCMD de 2008

		QCMD 2008		
		+	-	
QPCR <i>in house</i>	+	3	0	3
	-	2	7	9
		5	7	12

QCMD, *Quality Control for Molecular Diagnostics*; QPCR, Reacção de Polimerização em Cadeia Quantitativa em Tempo-Real

Tabela XIV – Comparação dos resultados da quantificação do Poliomavírus JC obtidos por dois métodos diferentes

Produtos	Carga viral (cópias/ μ l)	
	QPCR <i>in house</i>	QCMD 2008
J1	3,5	1,2
J2	25	16,5
J3	0	0,4
J4	1	3
J5	0	0,3

QCMD, *Quality Control for Molecular Diagnostics*; QPCR, Reacção de Polimerização em Cadeia Quantitativa em Tempo-Real

Foi possível constatar que a especificidade da QPCR *in house* foi de 100% e a sensibilidade de 60% (Tabela XIII). Apesar de se ter considerado que a QPCR *in house* para o JCV apresentava uma sensibilidade de 10 cópias/ μ l, neste estudo foi possível quantificar cargas virais inferiores a esse valor, com a excepção dos produtos J3 e J5 (Tabela XIV), os quais foram considerados negativos. Deste modo, é possível que o valor real da sensibilidade da QPCR *in house* seja inferior a 10 cópias/ μ l, mas superior a 1 cópia/ μ l, uma vez que nos ensaios de optimização, esta concentração nem sempre foi quantificável.

No entanto, e uma vez que a presença do JCV no LCR se traduz no desenvolvimento da LEMP, foram testadas diferentes condições da QPCR numa tentativa de baixar o limite inferior de detecção. Para tal, foi avaliado o aumento do volume de DNA na reacção, bem como o aumento do número de ciclos de amplificação (de 50 para 60 ciclos). Apesar destas alterações, não foi possível diminuir o limiar de detecção da QPCR *in house* e, conseqüentemente, continuou a não ser possível quantificar os produtos J3 e J5.

Devido ao pequeno número de casos estudados, não foi possível realizar uma análise que fornecesse resultados com significância estatística, apesar do teste *Wilcoxon Signed Ranks* indicar que, para cada produto, a diferença entre os valores da carga viral obtidos com a QPCR *in house* e os valores apresentados pelo painel QCMD, não ser estatisticamente significativa.

2.3. Quantificação dos Poliomavírus JC e BK

A quantificação do JCV foi realizada em 34 LCR positivos pelo sistema comercial anteriormente referido e em uso no laboratório. Os valores de carga viral mais elevado e mais baixo foram $1,8 \times 10^4$ cópias/ μ l e 1 cópia/ μ l, respectivamente, e foram identificados em indivíduos VIH positivos. É de referir que em três casos, a QPCR *in house* não detectou a presença do vírus (0 cópias/ μ l). Esta falha na detecção pode ter sido devida à eventual carga viral baixa presente nestes produtos pois, tal como verificado durante a optimização da metodologia, esta nem sempre permite detectar o vírus quando este se encontra numa concentração inferior a 10 cópias/ μ l. Deste modo, foi possível verificar que a QPCR não foi a forma mais adequada de detecção. A baixa sensibilidade observada pode ser o resultado de

uma sub-otimização ou ser uma limitação inerente à própria metodologia. Estudos posteriores são necessários.

A quantificação do BKV, através do sistema comercial anteriormente referido, foi realizada em oito urinas positivas para este vírus, previamente testadas pela PCR *in house* implementada. Os valores de carga viral variaram entre 200 cópias/ μ l e $1,89 \times 10^7$ cópias/ μ l. Todas as amplificações foram eficientes, com rectas de calibração com declives de cerca de -3,3 e r^2 próximo de 1 (Anexo 6, Figura 9).

Apesar de se tratar de um sistema de detecção comercializado, foram testados os produtos dos painéis QCMD de 2008 e 2009, de forma a validar os resultados obtidos (Tabela XV e Tabela XVI).

Tabela XV – Comparação dos resultados da QPCR comercial do Poliomavírus BK com o painel de avaliação externa de qualidade QCMD de 2008 e de 2009

		QCMD 2008 e 2009		
		+	-	
<i>BKV Q-PCR Alert kit</i>	+	11	0	11
	-	5	7	12
		16	7	23

QCMD, *Quality Control for Molecular Diagnostics*; QPCR, Reacção de Polimerização em Cadeia Quantitativa em Tempo-Real

Tabela XVI – Comparação dos resultados da quantificação do Poliomavírus BK obtidos pelo sistema comercial e pelo painel de avaliação externa de qualidade QCMD de 2008 e de 2009

Produtos	Carga viral (cópias/ μ l)	
	<i>BKV Q-PCR Alert kit</i>	QCMD 2008 e 2009
B1	745	20
B2	557	65
B3	0	0,2
B4	0	0,4
B5	115	2
B6	135	65
B7	45	2,2
B8	0	0,2
B9	0	0,4
B10	10	20
B11	2	1,7
B12	0	0,5
B13	2	1,2
B14	3	5
B15	27	50
B16	4	1,2

BKV, Poliomavírus BK; QCMD, *Quality Control for Molecular Diagnostics*; QPCR, Reacção de Polimerização em Cadeia Quantitativa em Tempo-Real

O sistema comercial utilizado apresentou uma sensibilidade de 68,75% e uma especificidade de 100% (Tabela XV). Tal como verificado para o caso do JCV, esta técnica apresentou uma baixa sensibilidade. Cinco (5/16) produtos dos painéis QCMD foram considerados como negativos por este sistema. No entanto, se considerarmos que o limite de detecção deste sistema comercial é, segundo o fabricante, de 2 cópias/ μ l é possível compreender o porquê de não terem sido detectados. Uma vez que, a excreção do BKV na urina pode ser momentânea e/ou ocorrer em indivíduos saudáveis, apenas em casos de virúria acentuada (mais de 1×10^4 partículas/ μ l) ⁽¹²⁾ é que esta pode ser considerada um indicador de doença, sendo que, valores de virúria mais baixos, apenas podem ser interpretados como uma

consequência da reactivação deste vírus. Por outro lado, a detecção de mais de 10 partículas/ μ l no plasma é, à partida, uma forte indicação de progressão da PVAN ⁽⁶⁸⁾. Desta forma, podemos considerar que baixas cargas virais do BKV na urina não são, do ponto de vista clínico, significativas e que, portanto, este é um sistema apropriado à quantificação deste vírus.

Não foi possível realizar uma análise com significância estatística. No entanto, o teste *Wilcoxon Signed Ranks* indicou que os valores de quantificação do BKV obtidos, pelo sistema comercial avaliado e pelos painéis QCMD, são similares.

3. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS POLIOMÁVIRUS JC E BK

Para a caracterização molecular do JCV foram estudados 66 LCR positivos para este vírus, pelo sistema comercial *JCV/BKV Oligomix Alert kit* (Nanogen, EUA), da casuística do laboratório. A maioria dos casos provinha de Entidades Hospitalares da região de Lisboa e apresentavam sintomatologia sugestiva da infecção por JCV ou diagnóstico de LEMP.

Através da utilização da PCR específica para a caracterização molecular, o JCV foi detectado em apenas 80,3% (53/66) dos LCR estudados. Destes, 77,4% (41/53) correspondiam a indivíduos com infecção por VIH e 70,8% (37/53) eram do sexo masculino (Tabela XVII).

Tabela XVII – Distribuição dos casos positivos para o Poliovírus JC estudados ($n = 53$) em função do género e da infecção por VIH

Características da população		Casos Positivos Estudados
Género	Feminino	30,2% (16/53)
	Masculino	70,8% (37/53)
Infecção por VIH	Sim	77,4 % (41/53)
	Não	22,6% (12/53)

VIH, Vírus da Imunodeficiência Humana

A possível utilização, na PCR para a caracterização molecular do JCV, de uma quantidade insuficiente de DNA ou deste se encontrar degradado, são possíveis causas da detecção deste vírus em apenas 80,3% (53/66) dos LCR positivos estudados.

Os resultados da caracterização molecular do JCV, encontram-se sumarizados na Tabela XVIII.

Tabela XVIII – Percentagem dos diferentes tipos do Poliovírus JC identificados

Tipos do JCV ($n = 53$)				
1B	2A	2B	3A	4
56,0% (30/53)	6,0% (3/53)	28,0% (15/53)	4,0% (2/53)	6,0% (3/53)

JCV, Poliovírus JC;

Neste estudo, o tipo mais frequentemente identificado foi o 1B (56,0%), o que está de acordo com o esperado, uma vez que este é o tipo mais prevalente na Europa (Figura 4). A elevada percentagem de tipos asiáticos do JCV, nomeadamente o 2B, pode ser consequência

do aumento da imigração de indivíduos oriundos desta região para o nosso país. Contrariamente ao esperado, a detecção do tipo 4, concentrado na região da Península Ibérica e no norte da Europa, foi de apenas 6,0%. Por fim, o tipo menos detectado foi o 3A (4,0%), normalmente associado às populações do norte de África. A árvore filogenética dos tipos do JCV identificados neste estudo encontra-se representada no Anexo 7 (Figura 10). Os produtos JCV positivos do painel QCMD de 2009 foram igualmente utilizados para a caracterização molecular deste vírus, de forma a validar a metodologia utilizada. Todos os produtos foram considerados como sendo do tipo 2B, o que estava de acordo com o referido no painel QCMD.

No caso do BKV, foram estudadas 28 urinas. Destas, oito eram provenientes dos Serviços de Imunodeficiência de vários hospitais e foram positivas para o BKV pelo sistema comercial *JCV/BKV Oligomix Alert kit* (Nanogen, EUA). As restantes 20 urinas, foram colhidas no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) e pertenciam a indivíduos imunocompetentes. A positividade neste grupo foi de 0% (0/20).

Os resultados da caracterização molecular dos oito casos BKV estudados (Tabela XIX) revelaram que o tipo mais prevalente foi o tipo II (62,5%; 5/8), seguido dos tipos Ib-1, Ib-2 e IV, com igual proporção de detecção (12,5%; 1/8). A árvore filogenética dos tipos identificados encontra-se representada no Anexo 7 (Figura 11).

Tabela XIX – Percentagem dos diferentes tipos do Poliomavírus BK identificados

Tipos do BKV (n = 8)			
Ib-1	Ib-2	II	IV
12,5% (1/8)	12,5% (1/8)	62,5% (5/8)	12,5% (1/8)

BKV, Poliomavírus BK;

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O desenvolvimento e a optimização de novas técnicas de biologia molecular, para o diagnóstico e para o estudo dos Poliomavírus humanos, adquirem um papel cada vez mais relevante pois, para além de serem métodos de detecção não invasivos, apresentam uma maior sensibilidade e especificidade relativamente aos métodos tradicionais de diagnóstico da infecção por JCV (imagiologia), por BKV (citologia) e por MCV (histologia). Simultaneamente, podem ser aplicados ao diagnóstico, bem como ao estudo da etiopatologia dos novos Poliomavírus (KIV e WUV).

Através dos sistemas de amplificação *in house* desenvolvidos e optimizados foi possível detectar o BKV e os novos Poliomavírus (KIV, WUV e MCV). No caso do BKV, a PCR optimizada mostrou ser 100% sensível e 100% específica.

Para a quantificação do JCV e do WUV, foram desenvolvidas QPCR eficientes, com especificidades de 100% e sensibilidades na ordem das 10 cópias/ μ l. No entanto, se considerarmos que a detecção de uma única cópia genómica do JCV no LCR (independentemente do volume utilizado no diagnóstico) é um indicador de LEMP emergente ou em progressão, a sensibilidade de 10 cópias/ μ l da QPCR *in house*, pode ser insuficiente e limitativa para o diagnóstico correcto deste vírus. A quantificação do BKV mostrou ser eficiente, específica (100%) e com uma sensibilidade adequada ao estudo realizado, considerando as limitações inerentes à própria técnica.

Na caracterização molecular do JCV, e de acordo com o descrito na literatura, o tipo europeu 1B foi o mais frequentemente detectado (56,0%). Contrariamente ao esperado, em 28% dos casos foi identificado o tipo 2B (asiático), possível consequência do aumento da imigração para o nosso país de indivíduos de países orientais. Relativamente ao BKV, o tipo mais detectado foi o II (62,5%).

Possíveis linhas de investigação a desenvolver seriam: **1)** tentar associar a reactivação do JCV a um valor de virémia (em cópias/ μ l de sangue), de forma a serem tomadas medidas terapêuticas que prevenissem a passagem deste vírus para o SNC; **2)** realizar um estudo epidemiológico em Portugal, para se determinarem as prevalências dos tipos do JCV e do BKV; **3)** verificar se algum tipo do JCV ou do BKV é mais ou menos virulento (facilidade de reactivação, indução de doença e infecção de outros órgãos); **4)** aplicar os métodos desenvolvidos para os novos Poliomavírus, a produtos biológicos e ao estudo de casos; **5)** proceder à quantificação do BKV no sangue, em indivíduos imunocomprometidos.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Norja P, Ubillos I, Templeton K, Simmonds P. No evidence for an association between infections with WU and KI polyomavirus. *J Clin Virol* 2007;40:307-311.
- 2) Zur Hausen H. Novel human polyomavirus – Re-emergence of a well known virus family as possible human carcinogens. *Intern J Cancer* 2008;123:247-250.
- 3) Liddington RC, Yan Y, Moulai J, Sahli R, Benjamin TL, Harrison SC. Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* 1991;354:278-284.
- 4) Stehle T, Gambi SJ, Yan Y, Harrison SC. The Structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure* 1996;4:165-182.
- 5) Elfaitouri A, Hammarin A, Blomberg J. Quantitative real-time PCR assay for detection of human polyomavirus infection. *J Virol Meth* 2006;135:207-213.
- 6) 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 polyomavirus. *J Virol Meth* 2006;135:32-42.
- 7) Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MAA, Dalianis T, Ramqvist T, Andersson B. Identification of a Third Human Polyomavirus. *J Virol* 2007; April:4130-4136.
- 8) Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, Brennan DC, Storch GA, Sloots TP, Wang D. Identification of a Novel Polyomavirus from Patients with Acute Respiratory Tract Infections. *PLoS Pathogens* 2007;3:0595-0604.
- 9) Jiang M, Abend JR, Johnson SF, Imperiale MJ. The role of polyomavirus in human disease. *Virology* 2008;384:266-273.
- 10) Sehbani L, Kabamba-Mukadi B, Vandenbroucke A, Bodéus M, Goubau P. Specific and quantitative detection of human polyomavirus BKV and JCV by LightCycler® real-time PCR. *J Clin Virol* 2006;36:159-162.
- 11) Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science* 2008;319:1096-1100.
- 12) Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis* 2003;3:611-623.
- 13) Meneguzzi G, Pignatti PF, Barbanti-Brodano G, Milanesi G. Minichromosome from BK virus as a template for transcription in vitro. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1978;75:1126-1130.
- 14) Muller U, Zentgraf H, Eicken I, Keller W. Higher order structure of simian virus 40 chromatin. *Science* 1978;201:406-415.
- 15) Padgett BL, ZuRhein G, Walker D, Echroade R, Dessel B. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet Infect Dis* 1971;1257-1260.
- 16) Stoner GL, Jobs DV, Cobo MF, Agostini HT, Chima SC, Ryschkewitch CF. JC Virus as a marker of human migration to the Americas. *Microbes and Infection* 2000;1905-1911.
- 17) Padgett BL, Walker DL. Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 1973;127:467.
- 18) Chesters PM, Heritage J, McCance DJ. Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *J Infect Dis* 1983;147:676-682.
- 19) Arthur RR, Dagostin S, Shah KV. Detection of BK Virus and JC Virus in Urine and Brain Tissue by Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* 1989;27:1174-1179.
- 20) Kitamura T, Kunitake T, Guo J, Tominaga T, Kawabe K, Yogo Y. Transmission of the Human Polyomavirus JC Virus Occurs both within Family and Outside the Family. *J Clin Microbiol* 1994;10:2359-2363.
- 21) Lafon M, Dutronc H, Dubois V, Pellegrin I, Barbeau P, Ragnaud J, Pellegrin J, Fleury HJA. JC Virus Remains Latent in Peripheral Blood B Lymphocytes but Replicates Actively in Urine from AIDS Patients. *J Infect Dis* 1998;177:1502-1505.
- 22) Sabath BF, Major EO. Traffic of JC Virus from Sites of Initial Infection to the Brain: The Path to Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 2002;2:180-186.
- 23) Miralles P, Berenguer J, Garcia de Viedma D, Padilla B, Cosin J, López-Bernardo de Quirós JC, Munoz L, Moreno S, Bouza E. Treatment of AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 1998;12:2467-2472.

- 24) Sala M, Vartanian J, Kousignian P, Delfraissy J, Taoufik Y, Wain-Hobson S, Gasnault J. Progressive multifocal leukoencephalopathy in human immunodeficiency virus type 1-infected patients: absence of correlation between JC virus neurovirulence and polymorphisms in the transcriptional control region and the major capsid protein loci. *J Gen Virol* 2001;82:899-907.
- 25) 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 Rev* 1992;1:49-73.
- 26) Bofill-Mas S, Girones R. Excretion and Transmission of JCV in human population. *J Neurovirol* 2001;7:345-349.
- 27) Monaco MCG, Atwood WJ, Gravell M, Tornatore CS, Major EO. JC Virus Infections of Hematopoietic Progenitor Cells, Primary B Lymphocytes, and Tonsillar Stromal Cells: Implications for Viral Latency. *J Virol* 1996;10: 7004-7012.
- 28) Kunitake T, Kitamura T, Guo J, Taguchi F, Kawabe K, Yogo Y. Parent-to-child transmission is relatively common in the spread of the human polyomavirus JC virus. *J Clin Microbiol* 1995;33:1448-1451.
- 29) Weber T, Weber F, Petry H, Luke W. Immune response in progressive multifocal leukoencephalopathy: An overview. *J Neurovirol* 2001;7:311-317.
- 30) Hammarin A, Bogdanovic G, Svedhem V, Pirskanen R, Morfelt L, Grandien M. Analysis of PCR as a tool for Detection of JC Virus DNA in Cerebrospinal Fluid for Diagnosis of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *J Clin Microbiol* 1996;34:2929-2932.
- 31) Garcia de Viedma D, Alonso R, Miralles P, Berenguer J, Rodriguez-Cr ixems M, Bouza E. Dual Qualitative-Quantitative Nested PCR for Detection of JC Virus in Cerebrospinal Fluid: High Potential for Evaluation and Monitoring of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in AIDS Patients Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy. *J Clin Microbiol* 1999;3:724-728.
- 32) Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovirus (BK) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet Infect Dis* 1971;1:253-1257.
- 33) Jin L, Gibson PE, Booth JC, Clewley P. Genomic Typing of BK Virus in Clinical Specimens by Direct Sequencing of Polymerase Chain Reaction Products. *J Med Virol* 1993;41:11-17.
- 34) Knowles WA. The epidemiology of BK virus and the occurrence of antigenic and genomic subtypes. In: Khalili K, Stoner GL, (Eds), Human Polyomavirus: *Mol Clin Perspectives*. Wiley-Liss Inc, New York 2001;527-559.
- 35) Takasaka T, Goya N, Tokumoto T, Tanabe K, Toma H, Ogawa Y, Hokama S, Momose A, Funyu T, Fujioka T, Omori S, Akiyama H, Chen Q, Zheng H, Ohta N, Kitamura T, Yogo Y. Subtypes of BK virus prevalent in Japan and variation in their transcriptional control region. *J Gen Virol* 2004;85:2821-2827.
- 36) Stolt A, Sasnauskas K, Koskela P, Lehtinen M, Dillner J. Seroepidemiology of the human polyomavirus. *J Gen Virol* 2003;84:1499-1504.
- 37) Randhawa P, Ramos E. BK viral nephropathy: an overview. *Transplantation Reviews* 2007;21:77-85.
- 38) Randhawa P, Vats A, Shapiro R. Monitoring for polyomavirus BK and JC in urine: comparison of quantitative polymerase chain reaction with urine cytology. *Transplantation* 2005;79:984-986.
- 39) Vanchiere JA, Nicome RB, Greer JM, Demmler GJ, Butel JS. Frequent Detection of Polyomavirus in Stool Samples from Hospitalized Children. *J Infect Dis* 2005;192:658-664
- 40) Kalvatchev Z, Slavov S, Shtereva M, Savova S. Reactivation of *Polyomavirus hominis* 1 (BKV) during pregnancy and the risk of mother-to-child transmission. *J Clin Virol* 2008;43:328-329.
- 41) Heritage J, Chesters PM, McCance DJ. The persistence of papovavirus BK DNA sequences in normal human renal tissue. *J Med Virol* 1981;8:143-150.
- 42) Arthur RR, Shah KV, Baust SJ, Santos GW, Saral R. Association of BK viruria with hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants. *New Eng J Med* 1986;315:230-234.
- 43) Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Ramos E. Histologic versus Molecular Diagnosis of BK Polyomavirus-Associated Nephropathy: A Shifting Paradigm? *Clin J American Soc Nephrol* 2006; 1:374-379.

- 44) Moens U, Rekvig OP. Molecular biology of BK virus and clinical and basic aspects of BK virus renal infection. In: Khalili K, Stoner G L (Eds), Human Polyomavirus: *Mol Clin Perspectives*. Wiley-Liss, Inc, New York 2001;527-559.
- 45) Barri YM, Ahmad I, Ketel BL, Barone GW, Walker PD, Bonsib SM, Abul-Ezz SR. Polyoma viral infection in renal transplantation: the role of immunosuppressive therapy. *Clinical Transplantation* 2001;15:240-246.
- 46) Babakir-Mina M, Ciccozzi M, Dimonte S, Farchi F, Valdarchi C, Rezza G, Perno CF, Ciotti M. Identification of the Novel KI Polyomavirus in the Respiratory Tract of an Italian Patient. *J Med Virol* 2008;80:2012-2014.
- 47) Ren L, Gonzalez R, Xie Z, Zhang J, Liu C, Li J, Li Y, Wang Z, Kong X, Yao Y, Hu Y, Qian S, Geng R, Yang Y, Vernet G, Paranhos-Baccalà G, Jin Q, Shen K, Wang J. WU and KI polyomavirus present in the respiratory tract of children, but not in immunocompetent adults. *J Clin Virol* 2008;3:330-333.
- 48) Bialasiewicz S, Whiley DM, Lambert SB, Jacob K, Bletchly C, Wang D, Nissen MD, Sloots TP. Presence of the newly discovered human polyomavirus KI and WU in Australian patients with acute respiratory tract infection. *J Clin Virol* 2008;41:63-68.
- 49) Lin F, Zheng M, Li H, Zheng C, Li X, Rao G, Zheng M, Wu F, Zeng A. WU polyomavirus in children with acute lower respiratory tract infections, China. *J Clin Virol* 2008;1:94-102.
- 50) Payungporn S, Chieochansin T, Thongmee C, Panjaworayan N, Samransamruajkit R, Theamboolers A, Poovorawan Y. Detection and discrimination of WU/KI polyomavirus by real-time PCR with melting curve analysis. *J Virol Meth* 2008;153:70-73.
- 51) Wattier RL, Vázquez M, Weibel C, Shapiro ED, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. Role of Human Polyomavirus in Respiratory Tract Disease in Young Children. *Emerg Infect Dis* 2008;11:1766-1768.
- 52) van der Zalm MM, Rossen JWA, van Ewijk BE, Wilbrink B, van Esch PCHM, Wolfs TFW, van der Ent CK. Prevalence and Pathogenicity of WU and KI Polyomavirus in Children, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2008;11:1787-1789.
- 53) Han TH, Chung J, Koo JW, Kim SW, Hwang E. WU Polyomavirus in Children with Acute Lower Respiratory Tract Infections, South Korea. *Emerg Infect Dis* 2007;11:1766-1768.
- 54) Ren L, Gonzalez R, Xu X, Li J, Zhang J, Vernet G, Paranhos-Baccalà G, Jin Q, Wang J. WU Polyomavirus in Fecal Specimens of Children with Acute Gastroenteritis, China. *Emerg Infect Dis* 2009;1:134-135.
- 55) Abed Y, Wang D, Boivin G. WU Polyomavirus in Children, Canada. *Emerg Infect Dis* 2007;12:1939-1941.
- 56) Neske F, Blessing K, Pröttel A, Ullrich F, Kreth H W, Weissbrich B. Detection of WU polyomavirus DNA by real-time PCR in nasopharyngeal aspirates, serum, and stool sample. *J Clin Virol* 2009;44:115-118.
- 57) Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. Seroepidemiology of Human Polyomavirus. *PLoS Pathogens* 2009;5:1-10.
- 58) Becker JC, Schrama D, Houben R. Merkel Cell Carcinoma. *Cell Mol Life Sc* 2009;66:1-8.
- 59) Bialasiewicz S, Lambert SB, Whiley DM, Nissen MD, Sloots TP. Merkel Cell Polyomavirus DNA in Respiratory Specimens from Children and Adults. *Emerg Infect Dis* 2009;3:492-494.
- 60) Goh S, Lindau C, Tiveljung-Lindell A, Allander T. Merkel Cell Polyomavirus in respiratory Tract Secretions. *Emerg Infect Dis* 2009;3:489-491.
- 61) Foulongne V, Brieu N, Jeziorski E, Chatain A, Rodière M, Segondy M. KI and WU Polyomavirus in Children, France. *Emerg Infect Dis* 2008;3:523-525.
- 62) Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 2004;5:150-163.
- 63) McNees AL, White ZS, Zanwar P, Vilchez RA, Butel JS. Specific and quantitative detection of human polyomavirus BKV, JCV and SV40 by real time PCR. *J Clin Virol* 2005;34: 52-62.
- 64) Bialasiewicz S, Whiley DM, Lambert SB, Gould A, Nissen MD, Sloots TP. Development and evaluation of real-time PCR assays for the detection of the newly identified KI and WU polyomavirus. *J Clin Virol* 2007;40: 9-14.
- 65) Frisque RJ, Bream GL, Cannella MT. Human Polyomavirus JC Virus Genome. *J Virol* 1984;51:458-469.

- 66) Seif I, Khoury G, Dhar R. The genome of human papovavirus BKV. *Cell* 1979;18:963-977.
- 67) Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;39:783-791.
- 68) Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal transplant recipients. *New Eng J Med* 2006;21:3364-3367.

ANEXOS

1. PREPARAÇÃO DE CALIBRADORES DA QPCR DOS POLIOMAVÍRUS JC E WU

a) Fazer uma PCR, com os *primers* específicos da QPCR, para amplificação da região de interesse; **b)** Com o produto amplificado, iniciar o processo de clonagem, usando o sistema comercial *TOPO® TA Cloning Kit (with pCR®2.1 vector) without chemically competent E. coli* (Invitrogen™, EUA), segundo as instruções do fabricante (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ta_man.pdf); **c)** Seleccionar as colónias brancas (transformantes); **d)** Transferir cada uma delas para um tubo contendo 4 ml de meio LB (*Luria-Bertani*), com Kanamicina; **e)** Colocar a 37°C, durante a noite; **f)** Dividir os 4 ml de suspensão bacteriana por dois novos tubos de 2 ml; **g)** Conservar a suspensão de um dos tubos em meio TSB (*Tryptic Soy Broth*) + glicerol (20%) (Anexos 2); **h)** Proceder à extracção dos ácidos nucleicos da suspensão bacteriana do outro tubo, através do método da fervura (Anexo 3); **i)** Realizar uma PCR com o sistema de *primers* M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') e M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') (Anexo 4); **j)** Analisar os produtos amplificados num gel de agarose; **k)** Sequenciar os casos positivos para confirmar a integração do fragmento; **l)** Transferir 5 µl, dos 2 ml de suspensão bacteriana conservados em TSB+glicerol (20%), para novos tubos contendo 4 ml de LB+Kanamicina; **m)** Colocar a 37°C, durante a noite; **n)** Purificar os plasmídeos clonados, através do sistema comercial *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen™, USA), de acordo com as instruções do fabricante (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/purelink%20_quick_plasmid_qrc.pdf); **o)** Quantificar os plasmídeos por espectrofotometria; **p)** Calcular o número de cópias/µl de acordo com a fórmula:

$$N^{\circ} \text{ C\u00f3pias do Plasm\u00eddeo}/\mu\text{l} = [\text{DO (ng}/\mu\text{l)} / \text{MW (ng/mol)}] \times N^{\circ} \text{ Avogadro}$$

em que DO = densidade \u00f3ptica (nanogramas/microlitro) e MW = peso molecular de cada plasm\u00eddeo (vector com o inserto); **q)** Fazer dilui\u00e7\u00f5es seriadas (1:10), at\u00e9 se obterem as concentra\u00e7\u00f5es de 1×10^4 a 1×10^0 c\u00f3pias/ μl .

2. CONSERVAÇÃO DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS EM TSB + GLICEROL (20%)

a) Centrifugar 2 ml de suspensão bacteriana, a 2000 rpm durante 5 minutos; b) Recuperar o sedimento em 500 µl de TSB+glicerol (20%); c) Guardar a -80°C.

3. PROTOCOLO DE EXTRACÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS POR FERVURA

a) Centrifugar 2 ml de suspensão bacteriana, durante 10 minutos, a 14000 rpm; b) Rejeitar o sobrenadante; c) Lavar cuidadosamente o sedimento com soro fisiológico; d) Ressuspender em 100 µl de água (SIGMA); e) Colocar num banho a 100°C, durante 10 minutos; f) Centrifugar durante 10 minutos, a 14000 rpm; g) Transferir o sobrenadante para um novo tubo; h) Guardar a -20°C.

4. CONDIÇÕES DA PCR PARA CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM

A tabela seguinte (Tabela XX) mostra as condições da PCR utilizada para a confirmação da clonagem, na obtenção das construções do JCV e do WUV.

Tabela XX – Condições da PCR utilizada na confirmação dos clones dos Poliomavírus JC e WU obtidos

Poliomavírus	Condições da Reacção de Amplificação		Perfis de Amplificação
	Reagentes	Concentração na Reacção	
JCV/WUV	Tampão de Reacção	1X	40x
	Cada dNTP	0,4 mM	
	MgCl ₂	2,5 mM	
	M13F	0,4 µM	
	M13R	0,4 µM	
	<i>AmpliTaQGold</i>	1 U	
DNA	5 µL	95°C, 10 minutos	
		95°C, 30 segundos	
		52°C, 30 segundos	
		72°C, 30 segundos	
		72°C, 5 minutos	

5. RESULTADOS DAS CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZADAS NA DETECÇÃO DOS POLIOMAVÍRUS BK, KI, WU e MC

A Figura 6 mostra os resultados da optimização das PCR na amplificação do BKV, do KIV, do WUV e do MCV.

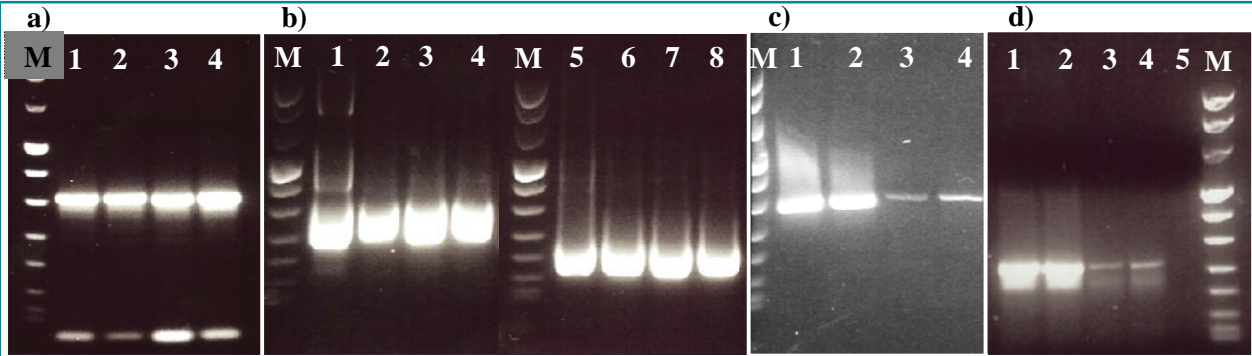


Figura 6 – Resultados da optimização da PCR dos Poliomavírus BK, do KI, do WU e do MC. **a)** amplificação do BKV utilizando 2,5 mM de MgCl₂ e 2,5 U polimerase (1), 2,5 mM de MgCl₂ e 1,5 U polimerase (2), 1,5 mM de MgCl₂ e 2,5 U polimerase (3) e 1,5 mM de MgCl₂ e 1,5 U polimerase (4); **b)** amplificação do KIV utilizando 2,5 mM de MgCl₂ e 2,5 U polimerase (1), 2,5 mM de MgCl₂ e 1,5 U polimerase (2), 1,5 mM de MgCl₂ e 2,5 U polimerase (3) e 1,5 mM de MgCl₂ e 1,5 U polimerase (4) e resultados do *nested*-PCR (5-8); **c)** amplificação do MCV utilizando 2,5 mM de MgCl₂ e 2,5 U polimerase (1), 2,5 mM de MgCl₂ e 1,5 U polimerase (2), 1,5 mM de MgCl₂ e 2,5 U polimerase (3) e 1,5 mM de MgCl₂ e 1,5 U polimerase (4); **d)** amplificação do WUV utilizando 2,5 mM de MgCl₂ e 2,5 U polimerase (1), 2,5 mM de MgCl₂ e 1,5 U polimerase (2), 1,5 mM de MgCl₂ e 2,5 U polimerase (3) e 1,5 mM de MgCl₂ e 1,5 U polimerase (4) e controlo negativo (5). **M** – Marcador molecular VIII (Roche, Suíça).

6. RECTAS DE CALIBRAÇÃO DA QPCR DOS POLIOMAVÍRUS JC, WU E BK

As figuras que se seguem são exemplos de rectas de calibração obtidas nas QPCR do JCV, do WUV e do BKV.

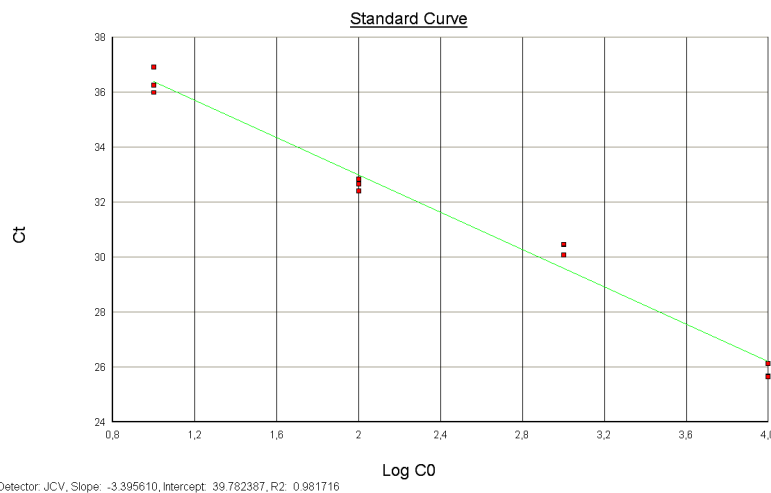


Figura 7 – Exemplo de uma recta de calibração da quantificação do Poliomavírus JC.

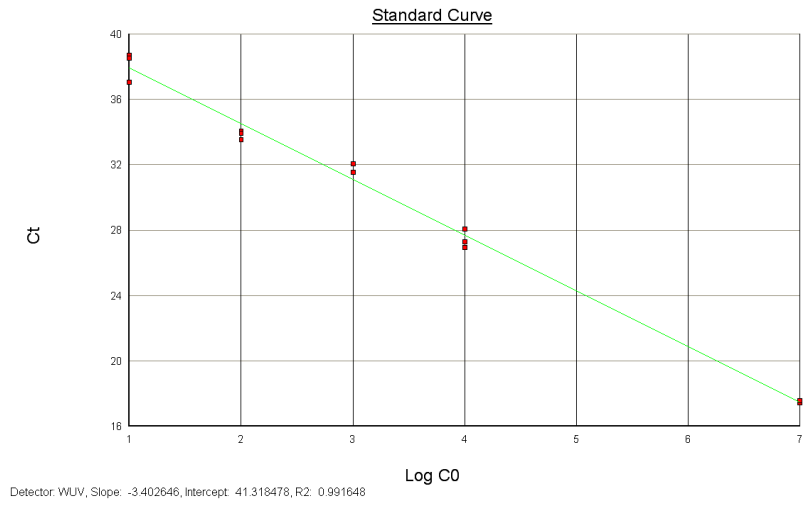


Figura 8 – Exemplo de uma recta de calibração da quantificação do Poliovírus WU.

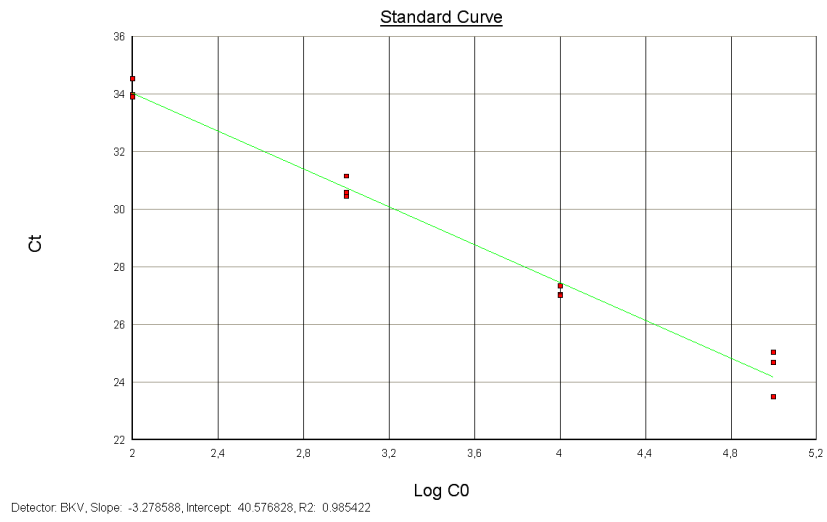


Figura 9 – Exemplo de uma recta de calibração da quantificação do Poliovírus BK.

7. ÁRVORES FILOGENÉTICAS DOS POLIOMÁVÍRUS JC E BK

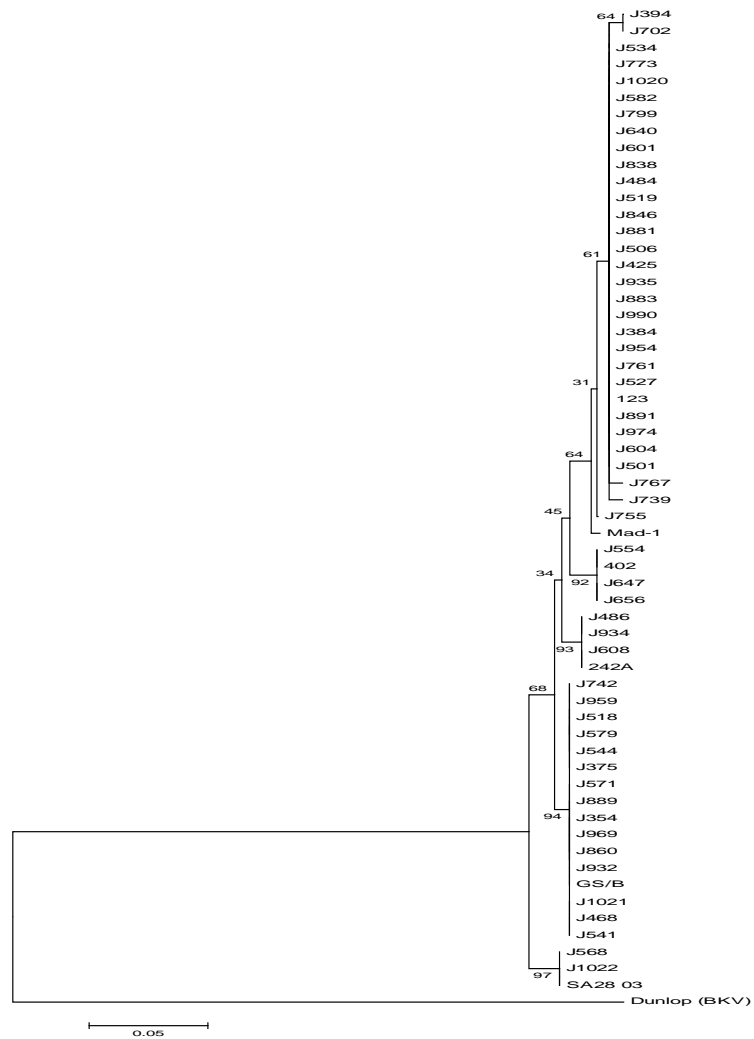


Figura 10 - Árvore filogenética do Poliovírus JC, baseada em 53 sequências parciais do gene da VP1 obtidas por PCR, seis sequências de referência dos genótipos identificados: *Mad-1* (tipo 1A), #123 (tipo 1B), 242A (tipo 2A), GS/B (tipo 2B), SA28_03 (tipo 3A) e #402 (tipo 4), e na sequência do BKV (*Dunlop*) como *outgroup*.

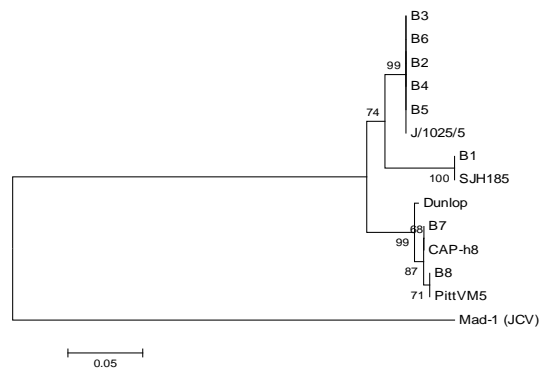


Figura 11 - Árvore filogenética do Poliovírus BK, baseada em 8 sequências parciais do gene da VP1 obtidas por PCR, cinco sequências de referência dos genótipos identificados: PittVM5, CAP-h8, *Dunlop*, SJH185 e J/1025/5, e na sequência do JCV (*Mad-1*) como *outgroup*.

8. RESUMO ACEITE PARA APRESENTAÇÃO DE POSTER EM CONGRESSO NACIONAL

Cara Participante

Informamos que o Seu trabalho foi aceite, na forma pretendida, para apresentação no 3º Congresso Nacional de Virologia/VII Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Virologia.

O poster terá que respeitar as dimensões previamente divulgadas e **afixado no local próprio até às 10h do primeiro dia do Congresso.**

O Seu poster é o Nº 14 e deverá respeitar essa numeração na afixação do mesmo.

O Secretariado

3.º Congresso Nacional da SPV

Secretariado - Judite Cruz

Apartado 9037

3001-001 Coimbra

E-Mail: congresso@spv.pt

Website : www.spv.pt

-----Mensagem original-----

De: angela.pista@insa.min-saude.pt [mailto:angela.pista@insa.min-saude.pt]

Enviada: quarta-feira, 21 de Outubro de 2009 16:00

Para: webmaster@spv.pt; angela.pista@insa.min-saude.pt; Geral da OrganIdeia, Lda.; João Gomes / OrganIdeia, Lda.; Secretariado / SPV

Assunto: Envio de Resumo para o 3.º Congresso Nacional da SPV / 2009.

Envio de Resumo para o 3.º Congresso Nacional da SPV / 2009

TÍTULO DO TRABALHO :

Título: Quantificação e caracterização molecular do poliomavírus BK detectado na urina de indivíduos imunocomprometidos

1.º Autor: Rita Ferreira

2.º Autor: Nuno Verdasca

3.º Autor: Fatima Ribeiro

4.º Autor: Angela Pista

5.º Autor:

Outros Autores:

Instituição: Instituto Nacional de Saude Doutor Ricardo Jorge

Telefone: 217519213

Telemóvel: 964460235

e-Mail: angela.pista@insa.min-saude.pt

Tipo de Apresentação: Poster

Resumo do Trabalho: Introdução: Estudos seroepidemiológicos apontam para uma elevada prevalência do BKV na população mundial, na ordem dos 75%. A primo-infecção ocorre maioritariamente durante a infância dos indivíduos, por volta dos 5 a 10 anos de idade com um valor de seroprevalência equivalente aos observados na idade adulta. Os sintomas da infecção primária são muitas vezes subclínicos ou semelhantes a um síndrome gripal.

Após a infecção inicial, o BKV persiste num estado latente e assintomático, ao nível dos rins, podendo haver reactivação sempre que existam alterações do sistema imunitário do hospedeiro. Nestes casos, podem surgir complicações graves, tais como as nefropatias associadas a Poliomavírus ou as cistites hemorrágicas, as quais são acompanhadas de um aumento da virúria. No caso dos indivíduos recém-transplantados, a reactivação do BKV pode conduzir à perda de função e/ou rejeição do transplante renal.

Objectivo: Determinação da carga viral e caracterização molecular do BKV na urina.

Material e Métodos: Foram estudados 28 indivíduos, 20 saudáveis e 8 imunocomprometidos. Os estudos da carga viral e caracterização molecular do BKV foram realizados em 8 urinas positivas pelo sistema comercial JCV/BKV Oligomix Alert kit. A quantificação foi realizada através do sistema comercial BKV Q-PCR Alert Kit e a caracterização molecular por sequenciação dos produtos da PCR in-house. O sistema BKV Q-PCR Alert Kit foi avaliado através do Painel de Controlo de Qualidade QCMD de 2008 e 2009.

Resultados: Os valores da carga viral variaram entre as 200 cópias/µl e 1,89x107 cópias/µl. Os resultados obtidos no estudo do painel do QCMD permitiram calcular a sensibilidade (68,8%) e especificidade (100%) para esta metodologia. O tipo de BKV mais prevalente foi o tipo II (68,5%).

Discussão: A quantificação do BKV mostrou ser eficiente, revelando valores de sensibilidade e especificidade adequados ao estudo realizado. Do ponto de vista clínico, a excreção do BKV na urina apenas parece ter significado nos casos em que a carga viral é superior a 1x104 partículas/µl. Estes resultados são preliminares e estão integrados num estudo em curso no laboratório.