

Proposta de reação em cadeia da polimerase (PCR) semi-nested para pesquisa e diferenciação dos vírus BK e JC

Proposal of semi-nested polymerase chain reaction (PCR) for diagnosing and differentiating BK and JC virus

JULIANA T. DOMINGUES¹
FERNANDA DE PARIS²
VIRGÍNIA M. SCHMITT³

RESUMO

Objetivos: Implantar e otimizar a reação em cadeia da polimerase (PCR) semi-nested para pesquisa e diferenciação dos vírus BK e JC a partir de amostras clínicas armazenadas.

Métodos: Foram testadas 9 amostras clínicas (urina e líquido). As amostras foram submetidas à PCR semi-nested, e foram testadas também com diferentes condições, visando a otimização da reação.

Resultados: Primeiramente os controles positivos foram testados quanto à especificidade através de uma PCR direta, e os resultados obtidos confirmaram a especificidade. Quando testadas por PCR semi-nested, as amostras apresentaram os seguintes resultados: 100% (nove amostras) positivas para o vírus BK e 66,6% (seis amostras) positivas para o vírus JC.

Conclusões: Otimizou-se a reação de PCR semi-nested, específica para a identificação dos poliovírus, para assim atuar como uma ferramenta diagnóstica para melhor acompanhamento de pacientes imunocomprometidos.

DESCRIPTORIOS: TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR; REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE; POLYOMAVIRUS; VIRUS JC; VIRUS BK; IMUNOSSUPRESSÃO.

ABSTRACT

Aims: To implant and optimize the semi-nested polymerase chain reaction (PCR) to identify and differentiate BK and JC virus.

Methods: Nine clinical (urine and liquor) samples have been tested with semi-nested PCR. In order to optimize this reaction, different conditions have been tested.

Results: Specificity has been confirmed by using JC and BK positive controls. When tested with semi-nested PCR, the clinical samples showed the following results: 100% (nine samples) positive from BK virus, and 66.6% (six samples) positive from JC virus.

Conclusions: The semi-nested PCR reaction, specific for identification of polyomavirus, was optimized for acting as a tool for better follow-up of immunocompromised patients.

KEY WORDS: MOLECULAR DIAGNOSTIC TECHNIQUES; JC VIRUS; BK VIRUS; POLYMERASE CHAIN REACTION; POLYOMAVIRUS; IMMUNOSUPPRESSION.

¹ Acadêmica da Faculdade de Farmácia da PUCRS e estagiária do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

² Mestre em Ciências Biológicas/Bioquímica da UFRGS e Bioquímica do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

³ Doutora em Virologia Molecular - Università degli Studi di Roma "La Sapienza" - Roma - Itália. Coordenadora do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia e do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

INTRODUÇÃO

Os vírus BK (BKV) e JC (JCV) foram primeiramente descritos em 1971. Eles foram isolados de culturas de células inoculadas, respectivamente, com urina de um paciente e líquido de outro. Os nomes dos vírus referem-se às iniciais dos pacientes nos quais foram identificados.^{1,2} Esses vírus foram classificados no gênero *Polyomavirus*, família *Papovaviridae*.^{3,4}

A organização e a estrutura dos vírus BK e JC são muito semelhantes: apresentam 75% de similaridade no genoma e 68% nos aminoácidos. O genoma é composto por uma fita dupla de DNA, que pode ser dividida em três regiões: precoce, tardia e não-codificadora. A região precoce codifica proteínas não estruturais, denominadas antígenos T. A região tardia codifica as três proteínas do capsídeo viral (VP1, VP2, VP3), sendo a proteína VP1 externa e, provavelmente, envolvida na interação com a proteína receptora celular no momento da adesão. Esta proteína é responsável pela capacidade hemaglutinante do vírus, *in vitro* e *in vivo*. Anticorpos antiVP1 neutralizam a infecção e previnem a hemaglutinação. VP2 e VP3 são proteínas internas do capsídeo viral e provavelmente auxiliam na estrutura deste. A região não-codificadora é o local de controle de replicação e transcrição do DNA.^{5,6}

Os poliomavírus têm alta especificidade, tanto em relação ao hospedeiro quanto aos tipos celulares que infectam. Em seres humanos, penetram pelas vias respiratórias, disseminando-se pela corrente sanguínea (viremia).⁶ Ambos os vírus são excretados na urina de pacientes infectados, o que sugere que o rim possa ser infectado em estágios precoces do contato com esses patógenos. No caso do JCV, tecidos linfóides e medula óssea também parecem estar envolvidos como sítios iniciais ou de infecção latente.³ Nos pacientes imunocomprometidos, a reativação do BKV nos rins leva à infecção no trato urinário, causando cistite hemorrágica; a reativação do vírus JC pode causar infecção no sistema nervoso central, desenvolvendo leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP).^{3,5-7} Existem relatos recentes de detecção do BKV no líquido cerebrospinal e em amostras de tecidos do cérebro de pacientes imunocomprometidos e imunossuprimidos com sintomas neurológicos, fortalecendo, assim, a necessidade de um diagnóstico diferencial entre BKV e JCV.⁶

A infecção primária geralmente acomete os indivíduos na infância e é virtualmente assintomática, embora possam ocorrer sintomas respiratórios leves e tenha sido relatada cistite.^{3,8}

Entre 60 e 80% dos adultos têm anticorpos contra ambos os poliomavírus.^{3,8,9} Na Alemanha, em 1993, Dörries et al.¹⁰ pesquisaram o DNA dos poliomavírus (BKV e JCV) em leucócitos do sangue periférico em 42 pacientes, entre eles recém-nascidos (n=10), adultos saudáveis (n=18), pacientes com LMP (n=3) e pacientes com a doença de Huntington (n=11), doença que, assim como a LMP, compromete o sistema nervoso central. Nenhum recém-nascido apresentava DNA do vírus BK ou do JC, o que reforça o fato de que a primeira infecção acomete os indivíduos na infância. Entre os adultos saudáveis a prevalência de DNA do JCV foi de 83%, e 94% apresentavam DNA do BKV. Foi identificado DNA de ambos os vírus em 50% dos pacientes com doença de Huntington e em 100% dos pacientes com LMP.

As manifestações clínicas de infecção ocorrem principalmente em adultos imunocomprometidos, incluindo HIV positivos, indicando reativação de uma infecção latente.⁶ Pacientes transplantados e, portanto, imunossuprimidos, também têm alta incidência de infecção por poliomavírus. Quanto mais tempo o paciente permanece imunossuprimido, maior é a frequência de reativação do vírus polioma latente.⁴

O vírus BK fica latente nos rins, causando doenças no trato urogenital, principalmente em pacientes transplantados renais. A doença do BKV é bastante variável, sendo esta variabilidade determinada pela qualidade e quantidade dos fatores imunes do hospedeiro.¹ Apesar de ter sido descrita há muitos anos, a nefropatia por polioma não havia sido clinicamente observada até a metade da última década. Porém, nos últimos anos, houve um aumento da incidência dos casos de nefropatia por polioma, aumento este atribuído à melhora das técnicas diagnósticas e, principalmente, pela potencialidade cada vez maior da imunossupressão.² O vírus BK pode ser detectado em tecidos ou células do trato urogenital, através de técnicas como imunofluorescência e imunoperoxidase, além de técnicas histopatológicas com amostras de urina. Entre as técnicas histopatológicas, a detecção de *decoy cells* em amostras de urina pode ser indicativa da replicação do vírus BK no trato urogenital. Porém, este marcador possui um valor preditivo

positivo de 27%, necessitando de confirmação com técnicas mais específicas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR).^{6,11,12}

A LMP, síndrome clínica causada pelo vírus JC, era raramente observada antes da epidemia do HIV. É uma doença que afeta pacientes com deficiências nas células regulatórias do sistema imune, podendo resultar do tratamento com medicamentos imunodepressores, como os esteróides. A incidência da LMP é de 4-5% nos pacientes infectados com HIV. A LMP causa distúrbios neurológicos focais de forma rápida e progressiva, distúrbios visuais, ataxia, hemiparesia, parestesia e mudanças comportamentais e cognitivas. Em pacientes com grau avançado de infecção por HIV, pode levar à morte após seis meses do diagnóstico.² O diagnóstico da LMP, assim como da nefropatia por polioma, pode ser feito analisando tecidos e células, através de técnicas de imunofluorescência, imunoperoxidase e PCR. A análise do líquido cefalorraquidiano por PCR está substituindo a biópsia cerebral no diagnóstico da infecção pelo vírus JC no sistema nervoso central, pois trata-se de um método menos invasivo.

O tratamento para as poliomavíroses ainda é bastante discutido. Não existe um tratamento eficaz para estas doenças, consistindo o mesmo em medidas de suporte, que envolvem a redução nas doses de agentes imunossupressivos. Porém, este tratamento requer cuidado, pois é provável que possa causar subsequente rejeição celular. Vêm sendo estudados vários agentes antivirais, entre os quais o cidofovir, o ácido retinóico e os inibidores da topoisomerase. A droga mais promissora é cidofovir, uma vez que *in vitro* possui atividade contra os poliomavírus. Porém, este medicamento está ainda em fase de testes.² O cidofovir também foi testado em estudos recentes por De Luca et al. na Itália, e demonstrou-se muito eficaz no tratamento de pacientes HIV positivos, em conjunto com a Terapia Antiretroviral de Alta Eficiência, diminuindo os níveis do DNA do JCV no líquido.¹³

Os métodos tradicionais para a detecção e identificação dos poliomavírus incluem sorologia, cultura celular para isolamento do vírus e microscopia eletrônica. A PCR é considerada o padrão-ouro para a sua detecção e identificação, visto que consegue diferenciar os vírus BK e JC, através da análise dos fragmentos de DNA gerados.^{14,15}

O objetivo deste estudo foi implantar uma reação de PCR *semi-nested* para identificação e

diferenciação dos poliomavírus, no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (LBMHCPA), a fim de obter um diagnóstico completo e diferencial para o estudo clínico dos pacientes e servir para posteriores estudos epidemiológicos.

MÉTODOS

Foram utilizadas no estudo nove amostras clínicas mantidas congeladas a 20°C negativos no LBMHCPA por um período máximo de nove meses, previamente testadas positivas para BKV e/ou JCV, porém sem definição precisa do agente infeccioso presente. Amostras clínicas previamente testadas e seqüenciadas foram utilizadas como controles positivos dos vírus BK e JC, a fim de testar a especificidade da reação proposta.

A extração do DNA das amostras foi realizada utilizando o sistema QIAamp (Qiagen®), seguindo as instruções do fabricante. O DNA purificado foi removido das colunas QIAamp com 70 µL de tampão de eluição.

A especificidade de hibridização dos *primers* foi confirmada através do sistema BLAST, no sítio do *National Center for Biotechnology Information and National Library of Medicine* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

As amostras de DNA foram amplificadas através de PCR *semi-nested*, onde a primeira reação amplifica seqüências virais do gênero *Polyomavirus*. O fragmento amplificado resultante é submetido a duas reações independentes, específicas para BKV ou para JCV. Na primeira reação, os *primers* são externos e consenso, PEP-1 (5'-AAG TCT TTA GGG TCT TCT AC-3') e PEP-2 (5'-GTG CCA ACC TAT GGA ACA GA-3'), produzindo um fragmento de 176 pares de base (pb). Na segunda reação, específica para o vírus BK, o *primer* interno específico para BK, BEP-1 (5'-GAG TCC TGG TGG AGT TCC-3'), é utilizado com o *primer* consenso PEP-1, amplificando um fragmento de 149 pb. Na segunda reação, específica para o vírus JC, utilizou-se o *primer* consenso PEP-1 e um *primer* interno específico para JC, JEP-1 (5'-GAA TCC TGG TGG AAT ACA-3') amplificando um fragmento de 146 pb.^{7,9}

A primeira etapa da reação de PCR foi realizada num volume total de 50 µL, contendo 5 µL de DNA extraído da amostra, 250 µM da mistura de dNTPs (desoxirribonucleotídeos) (ABgene®), 0,1 µM de cada *primer*, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (PHT), 50 mM KCL, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 a 25°C) e 1,5 mM MgCl₂. A amplificação

foi executada em termociclador Flexi Gene (Techne®), utilizando 30 ciclos, sendo que cada ciclo constava de desnaturação a 94°C por 30 segundos, seguido de anelamento 50°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos.⁹

Na segunda reação de amplificação, para BKV ou JCV, a concentração dos reagentes foi idêntica à primeira reação, porém totalizando um volume de reação de 25 µL. O programa de amplificação constou de desnaturação a 94°C por 30 segundos, seguido de anelamento 50°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos.⁹

Na tentativa de otimizar a reação de PCR semi-nested, foram realizados testes com os controles positivos alterando a quantidade de *amplicon* na segunda reação de amplificação. Foram transferidos 2,5 µL da primeira amplificação; 1 µL também da primeira amplificação ou 2,5 µL do amplificado da primeira reação diluído 1:10. As amostras foram testadas com a transferência de 2,5 µL da primeira amplificação diluído a 1:10.

Foram realizadas uma PCR direta para BKV e uma para JCV, com a intenção de buscar uma análise mais simples, contendo 2,5 µL de amostra num volume total de 25 µL. A concentração dos reagentes foi idêntica à reação de PCR semi-nested, exceto em relação aos *primers*, que foram utilizados nas concentrações de 0,1 µM e 0,5 µM. Na reação para o vírus BK, utilizou-se o *primer* interno específico para BK, BEP-1 e o *primer* consenso PEP-1, amplificando um fragmento de 149 pb. Na reação para o vírus JC utilizou-se o *primer* externo e consenso PEP-1 e um *primer* interno específico para JCV, JEP-1, amplificando um fragmento de 146 pb. O programa de amplificação utilizou as mesmas condições de tempo e temperatura citados anteriormente.

Os produtos finais das amplificações foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo 0,5 µg de brometo de etídio, utilizando-se 10 µL da segunda reação. A visualização foi realizada em transiluminador com luz ultravioleta. Um marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb) (Invitrogen®) foi utilizado para estimar o tamanho do fragmento amplificado.⁹

Os procedimentos de preparação dos reagentes, processamento da amostra, amplificação, transferência do produto da primeira para a segunda etapa de PCR e detecção do produto amplificado foram realizados em três ambientes distintos para eliminar a possibilidade de contaminação. Além disso, foram utilizadas pon-

teiras com filtros de barreira e controles negativos (branco de reação) em cada reação.

Foi realizada uma análise descritiva dos resultados de positividade para os vírus pesquisados, com números absolutos e frequências.

RESULTADOS

A fim de testar a especificidade dos *primers* (BEP-1 e JEP-1) utilizados na reação de PCR para identificar e diferenciar os vírus BK e JC, os controles positivos destes vírus foram amplificados através de uma PCR direta, e os resultados obtidos confirmaram a especificidade, ou seja, o controle de BKV foi positivo apenas quando foram utilizados os *primers* específicos para o vírus BK e o controle de JCV foi positivo apenas na PCR específica para o vírus JC (Figura 1).



Figura 1 - Teste de especificidade dos controles para BKV e JCV utilizados nas reações de PCR-nested. Colunas 1-5: reação com *primers* para JCV, sendo 4 e 5 controles positivos para BKV, 2 e 3 controle positivo para JCV e 1 branco de reação. Colunas 7-11: reação com *primers* para vírus BK, sendo 10 e 11 controles positivos para BKV, 8 e 9 controles positivos para JCV e 7 branco de reação. A coluna 6 corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb. A banda de 149 pb corresponde ao fragmento esperado para BKV e a de 146 pb, para JCV.

Os *primers* também foram testados para otimização das condições reacionais, através de três PCR semi-nested. Em uma primeira condição, foram transferidos 2,5 µL da primeira reação dos controles dos vírus BK e JC para a segunda etapa da PCR semi-nested (dados não apresentados). Na segunda condição, os *amplicons* da primeira reação dos poliomavírus foram diluídos 1:10 em água, e uma alíquota de 2,5 µL transferida para a segunda etapa. Na terceira condição, uma alíquota de 1 µL de cada amplificado da primeira etapa foi transferido para a segunda. Os resultados observados nestas reações mostraram que a segunda condição apresentou-se mais adequada para a realização dos testes com as amostras (Figura 2).

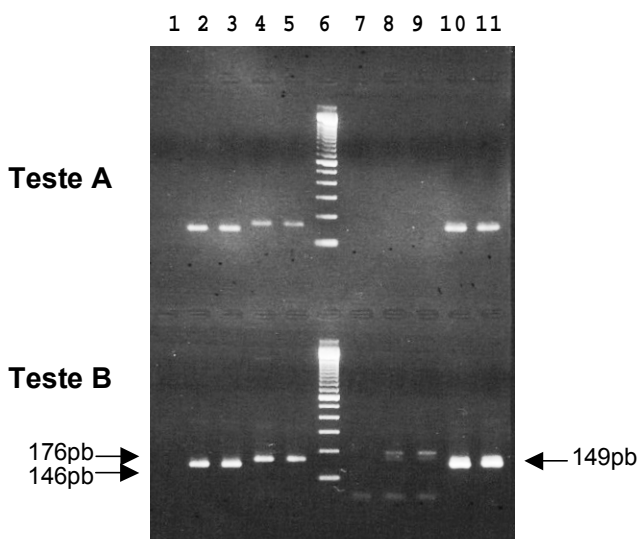


Figura 2 - Teste de otimização das condições de reação com controles positivos. Teste A - quando a 1ª reação foi diluído 1:10 para então uma alíquota de 2,5 µL foi transferida para a 2ª reação. 1-5 reação com primers para JCV, sendo 4 e 5 controles positivos para BKV, 2 e 3 controles positivos para JCV e 1 branco de reação. A posição 6 corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb. 7-11 reação com primers para BKV, sendo 10 e 11 controles positivos para BKV, 8 e 9 controles positivos para JCV e 7 branco de reação. Teste B - transferência de 1 µL da p1ª para a 2ª reação. 1-5 reação com primers para JCV, sendo 4 e 5 controles positivos para BKV, 2 e 3 controle positivo para JCV e 1 branco de reação. A coluna 6 corresponde ao marcador de 100pb. 7-11 reação com primers para BKV, sendo 10 e 11 controles positivos para BKV, 8 e 9 controles positivos para JCV e 7 branco de reação.

TABELA 1 - Resultado das amostras testadas por PCR semi-nested.

Amostra	Origem	BK	JC
A	Urina	Positivo	Negativo
B	Líquor	Positivo	Positivo
C	Urina	Positivo	Negativo
D	Urina	Positivo	Positivo
E	Urina	Positivo	Positivo
F	Urina	Positivo	Negativo
G	Urina	Positivo	Positivo
H	Urina	Positivo	Positivo
I	Urina	Positivo	Positivo

Os vírus BK e JC foram pesquisados através de PCR semi-nested em nove amostras clínicas (oito amostras de urina e uma de líquido), porque uma das dez amostras iniciais foi descartada por volume insuficiente. Os resultados obtidos foram de 100% (nove amostras) de positividade para o vírus BK, e 66,6% (seis amostras) de positividade para o JCV (Tabela 1 e Figura 3).

As nove amostras (oito amostras de urina e uma de líquido) também foram testadas por PCR direta. Primeiro foi realizada uma PCR utilizando 0,1 µM de primer. Nesta reação, o vírus BK foi pesquisado nas nove amostras, sendo 77,7% positivas. O vírus JC foi pesquisado em cinco amostras e 40% das amostras foram positivas para o vírus JC. Por fim, foi realizada outra PCR direta, nesta utilizando 0,5 µM de primer e foram pesquisadas as nove amostras. O vírus BK foi identificado em 100% (nove amostras), e o JC em 11,1% (uma amostra) (Tabela 2).

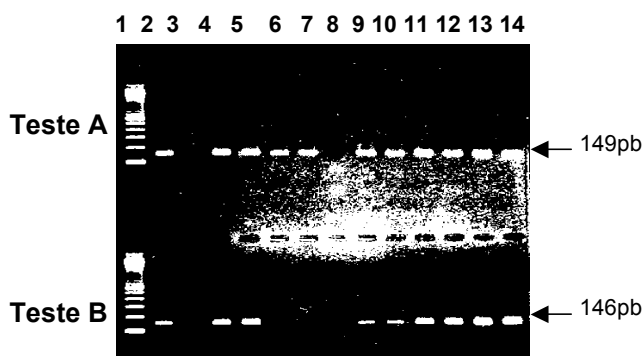


Figura 3 - Resultado das amostras de E a I testadas em duplicata por PCR semi-nested. Teste A: resultados da reação para o BKV. Colunas 4-7, 9-14. amostras positivas para o vírus BK; Colunas 3 e 8: brancos de reação; Coluna 2: controle positivo do BKV; Coluna 1: marcador de 100 pb. Teste B: resultados da reação para JCV. Colunas 4 e 5, 9-14: amostras positivas para o JCV; Colunas 6 e 7: amostras negativas para o JCV; Coluna 2 controle positivo do JCV; colunas 3 e 8: brancos de reação; Coluna 1: marcador de 100 pb.

TABELA 2 - Resultado das amostras testadas por PCR direta, com 0,1 µM de primer e 0,5 µM de primer.

Paciente	Amostra	0,1 µM de primer		0,5 µM de primer	
		BK	JC	BK	JC
A	Urina	Positivo	Não realizado	Positivo	Negativo
B	Líquor	Positivo fraco	Não realizado	Positivo	Negativo
C	Urina	Negativo	Negativo	Positivo fraco	Negativo
D	Urina	Positivo fraco	Não realizado	Positivo	Negativo
E	Urina	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
F	Urina	Positivo	Não realizado	Positivo	Negativo
G	Urina	Negativo	Negativo	Positivo fraco	Negativo
H	Urina	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
I	Urina	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

DISCUSSÃO

O desenvolvimento de técnicas moleculares, como a PCR, têm facilitado o diagnóstico de doenças infecciosas pelo fato de conseguir identificar e diferenciar agentes etiológicos através da análise dos fragmentos de DNA gerados.¹⁴

Neste estudo, desenvolveu-se uma técnica molecular específica para diferenciar os vírus BK e JC. Os iniciadores da reação de PCR foram escolhidos com base nos estudos de Arthur et al.⁷ e Nickleit et al.,⁹ e a especificidade das seqüências dos iniciadores foi confirmada por alinhamento de seqüências utilizando a ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Também foi realizada uma PCR para testar a especificidade dos controles positivos dos vírus BK e JC (Figura 1).

Foram realizados diversos testes com os controles positivos dos vírus BK e JC a fim de otimizar as condições das reações propostas. Inicialmente, trabalhamos com transferência de 2,5 µL do amplificado da primeira etapa. Constatamos que, nestas condições, havia, além da amplificação da banda específica dos vírus BK e JC, a presença muito intensa da banda da primeira etapa (comum aos dois poliomavírus) o que dificulta a leitura e, portanto, um correto diagnóstico. Sendo assim, transferimos um volume menor (1 µL), porém a banda do amplificado da primeira etapa ainda continuava muito intensa (Figura 2, Teste B). Conseguimos diminuir a intensidade da banda da primeira etapa quando o amplificado desta foi diluído a 1:10, para então ser transferido para o mix de reação da segunda etapa (Figura 2, Teste A). No teste das amostras por PCR *semi-nested*, onde a alíquota transferida da primeira etapa para a segunda etapa foi diluída a 1:10, obtivemos 100% de positividade para o vírus BK e 60% de positividade para o vírus JC.

Com o intuito de buscar uma análise mais simples e menos onerosa, tanto em tempo quanto em custos, foram testados dois protocolos de PCR direta. No primeiro protocolo, utilizando 0,1 µM de *primer*, não foram testadas todas as amostras para pesquisa do vírus JC, pois os primeiros dados apresentados demonstraram baixo índice de positividade quando comparados aos resultados da PCR *semi-nested*. Na tentativa de aumentar o índice de positividade para a PCR direta, aumentou-se a concentração dos *primers* para 0,5 µM e os resultados obtidos foram de

100% e 11,1% de positividade para os vírus BK e JC, respectivamente. Com base nestes resultados, a escolha do protocolo *semi-nested* parece mais adequada para o diagnóstico.

Arthur et al.⁷ detectaram e diferenciaram os vírus BK e JC através de amplificação do genoma viral por PCR seguida de técnicas como *southern blot* e/ou digestão com enzimas de restrição. Esses autores utilizaram o mesmo conjunto de *primers* do presente estudo, e seus resultados, quando realizada a PCR em um total de 11 urinas de pacientes transplantados, foram de 63,63% (sete amostras) positivas somente para o vírus BK, 9,09% (uma amostra) positiva somente para JC e 27,7% (três amostras) com co-infecção.⁷ Estes índices são um pouco mais baixos dos que obtivemos na presente pesquisa utilizando o protocolo *semi-nested*. Porém, deve-se considerar que nesta última década houve um aumento na potência da imunossupressão e, assim, um aumento da incidência do vírus BK na urina de pacientes transplantados.²

Behbahani et al. pesquisaram a prevalência dos vírus BK e JC em urinas de pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes, através da técnica de PCR. Em um total de 63 pacientes infectados pelo HIV, 30,1% (19 pacientes) apresentavam positividade para o vírus BK, 26,9% (17 pacientes) apresentavam virúria para o JCV e 25,5% (16 pacientes) apresentavam co-infecção.⁶ Dos 10 pacientes pesquisados que não eram infectados pelo vírus HIV, 20% (dois pacientes) apresentavam positividade para o vírus BK e 10% (um paciente) para o vírus JC, confirmando a maior prevalência dos poliomavírus na urina de pacientes imunocomprometidos. Porém, mesmo pacientes imunocompetentes excretavam os vírus BK e JC na urina, mostrando assim que o diagnóstico final depende sempre de uma conjugação de dados laboratoriais e clínicos.

Fedele et al. processaram amostras de urina de pacientes transplantados de medula óssea, afetados por cistite hemorrágica, e constataram um relevante envolvimento dos vírus BK e JC nas amostras, o que sugeria dupla infecção nesses pacientes.¹⁶ Segundo os autores, a excreção dos poliomavírus na urina de pacientes transplantados de medula óssea é um achado comum, e nem sempre é indicativo de doença. Pacientes imunossuprimidos devem ser acompanhados periodicamente quanto à excreção renal de poliomavírus e apresentação de cistite hemorrágica para controle da imunossupressão.²

Portanto, considerando o atual estudo sobre infecções por poliomavírus, torna-se necessária a otimização de uma reação de PCR específica para identificar BKV ou JCV. Neste estudo otimizou-se a reação de PCR *semi-nested*, específica para a identificação desses vírus, com condições de atuar como ferramenta diagnóstica para melhor acompanhamento de pacientes imunossuprimidos e imunocomprometidos.

REFERÊNCIAS

- Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis.* 2003;3:611-23.
- Kwark EJ, Vilchez AR, Randhawa P, et al. Pathogenesis and management of polyomavirus infection in transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2002;35:1081-7.
- Murray RP, Baron JE, Pfaller MA, et al. *Manual of clinical microbiology.* 7th ed. Washington: ASM; 1999.
- Hammarin AL, Bogdanovic G, Svedhem PR, et al. 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;34:2929-32.
- Wilson WR, Sande MA. *Doenças infecciosas: diagnóstico e tratamento.* Porto Alegre: Artmed; 2004.
- Behbahani BA, Klapper PE, Valley PJ, et al. Detection of BK virus and JC virus DNA in urine samples from immunocompromised (HIV-infected) and immunocompetent (HIV-non-infected) patients using polymerase chain reaction and microplate hybridization. *J Clin Virol.* 2004;9:224-9.
- 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;27:1174-9.
- Drews K, Bashir T, Dorries K. Quantification of human polyomavirus JC in brain tissue and cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy by competitive PCR. *J Virol Methods.* 2000;84:23-36.
- Nickeleit V, Hirsch HH, Isabelle BF, et al. Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10:1080-9.
- Dörries K, Vogel E, Günther S, et al. Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology.* 1994;198:59-70.
- Fogazzi GB, Cantú M, Saglimbeni L. 'Decoy cells' in the urine due to polyomavirus BK infection: easily seen by phase-contrast microscopy. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16:1496-8.
- Di Padova C. Stopping a medical research project for financial reasons. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19: 1015-23.
- De Luca A, Giancola ML, Ammassari A, et al. Cidofovir added to HAART improves virological and clinical outcome in AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *AIDS.* 2000;14:F117-21.
- Whiley DM, Mackay IM, Sloots TP. Detection and differentiation of human polyomaviruses JC and BK by LigthCycler PCR. *J Clin Microbiol.* 2001;39:4357-61.
- Randhawa P, Vats A, Shapiro R. Monitoring for polyomavirus BK and JC in urine: comparison of quantitative polymerase chain reaction with urine cytology. *Transplantation.* 2004;79:984-6.
- Fedele CG, Ciardi M, Delia S, et al. Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection and typing of polyomavirus JC, BK and SV40 DNA in clinical samples. *J Virol Methods.* 1999;82:137-44.

Endereço para correspondência:
 FERNANDA DE PARIS
 Laboratório de Biologia Molecular
 Hospital de Clínicas de Porto Alegre
 Rua Ramiro Barcelos, 2350 - 2º andar
 CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil
 Fone: (51) 2101-8000 - Fax: (51) 2101-8315
 E-mail: fparis@hcpa.ufrgs.br