

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
– UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

José Antonio Tesser Poloni

**Validação da Técnica de Detecção de Células Decoy por Microscopia
Óptica Convencional**

**Porto Alegre
2014**

José Antonio Tesser Poloni

**Validação da Técnica de Detecção de Células Decoy por Microscopia
Óptica Convencional**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Dra. Liane Nanci Rotta
Co-orientadora: Dra. Elizete Keitel

**Porto Alegre
2014**

Catálogo na Publicação

Poloni, José Antonio Tesser

Validação da Técnica de Detecção de Células Decoy por
Microscopia Óptica Convencional / José Antonio Tesser
Poloni. -- 2014.

109 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014.

Orientador(a): Liane Nanci Rotta ; coorientador(a):
Elizete Keitel.

1. Células decoy. 2. Políomavírus BK. 3. Sedimento
urinário. 4. Microscopia de campo claro. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

***Ao meu filho Pedro,
que está se preparando para
o momento mais importante
e mais aguardado de nossas vidas!***

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e a minha esposa por todo o amor e apoio que sempre dedicaram, não medindo esforços para dar as melhores condições possíveis para que eu pudesse me dedicar ao meu trabalho e estudos.

A minha orientadora e a minha co-orientadora pelo suporte e apoio recebidos durante todo o período do mestrado.

As equipes do Laboratório Central de Análises Clínicas – ISCMPA, do Laboratório de Biologia Molecular – ISCMPA, do Laboratório de Micologia e Patologia – ISCMPA e do Ambulatório de Nefrologia – ISCMPA pela ajuda para que o trabalho fosse possível.

Sinceramente, faltam palavras e espaço suficiente para citar nominalmente cada uma das pessoas que me ajudou na condução do projeto. Recebi ajuda de muitos amigos, cada um com sua parcela fundamental de participação. Ninguém alcança objetivo algum sozinho, sem a ajuda de um grande número de pessoas que dão suporte e ajudam das mais diversas formas.

Este trabalho só foi possível devido ao esforço de muitas pessoas que abriram mão de momentos de suas vidas para auxiliar um amigo.

Jamais conseguirei agradecer o suficiente a todos que colaboraram comigo para que eu pudesse concluir este trabalho.

RESUMO

O poliomavírus BK (BKV) é um agente patogênico que está fortemente associado à perda do enxerto em pacientes transplantados renais e é de grande prevalência na população. Os métodos diagnósticos utilizados para detecção do BKV ou mais especificamente das células decoy (células epiteliais tubulares renais modificadas pelo BKV) são trabalhosos, onerosos e muitas vezes requerem procedimentos invasivos, como por exemplo, a biópsia renal. A análise do sedimento urinário por contraste de fase já se mostrou eficiente para detecção destas células, porém, este recurso é muito pouco utilizado em laboratórios de análises clínicas. A análise do sedimento urinário por microscopia óptica convencional (campo claro) também pode ser utilizada para identificação destas células. O objetivo deste trabalho foi padronizar a técnica de detecção das células decoy utilizando microscopia de campo claro, a fim de introduzir este elemento na gama de achados reportados no exame comum de urina. Os resultados obtidos com este trabalho evidenciaram concordância entre os achados de células decoy por microscopia de campo claro e por coloração de Papanicolaou ($P < 0,001$). Também houve concordância do achado de células decoy com a virúria ($P < 0,001$) e a viremia por BKV ($P < 0,001$). Sensibilidade e especificidade da microscopia de campo claro, quando comparado ao padrão-ouro (imunoistoquímica da biópsia renal) foi 80% e 52%, respectivamente. Conclui-se que é possível realizar a identificação segura e confiável das células decoy no sedimento urinário sem utilizar qualquer tipo de coloração e com recurso de microscopia de campo claro, que está amplamente disponível em todos os laboratórios de análises clínicas. Este achado permite que se forneça de maneira rápida, indolor e com baixo custo a informação de uma possível reativação do BKV.

Palavras-chave: Células decoy, Poliomavírus BK, Sedimento urinário, Microscopia de campo claro

ABSTRACT

The polyomavirus BK (BKV) is a pathogenic agent strongly associated with graft loss in renal transplant recipients and have high prevalence in the population. The diagnostic methods used for detection of BKV or more specifically the decoy cells (renal tubular epithelial cells modified by the BKV) are laborious, expensive and often require invasive procedures, such as kidney biopsy. The analysis of urine sediment by phase contrast has proved efficient for the detection of these cells, however, this feature is rarely used in clinical laboratories. The analysis of fresh and unstained urinary sediment by bright field microscopy can be used to identify these cells. The objective of this study was to standardize the detection of decoy cells using bright field microscopy in order to introduce this find on the elements that can be reported during routine urine sediment analysis. The results obtained in this study revealed agreement between the finding of decoy cells by bright field microscopy in the fresh urine sediment and by Papanicolaou staining ($P<0.001$) . There was also agreement between the finding of decoy cells with BKV viruria ($P<0.001$) and BKV viremia ($P<0.001$). Bright field microscopy sensitivity and specificity, compared to gold standard (immunohistochemistry of the kidney biopsy) were 80% and 52%, respectively. Thus, we can conclude that it is possible to perform safe and reliable identification of decoy cells in urine sediment without using any kind of stain and using bright field microscopy, which is widely available in all clinical laboratories. This finding allows to provide quick, painless and inexpensive information of a possible reactivation of BKV .

Keywords: Decoy cells, Polyomavirus BK, Urine sediment, Bright field microscopy

LISTA DE ABREVIATURAS

BKV: BK vírus

DC: Decoy cells (células decoy)

DC – BFM: Decoy Cell under Bright Field Microscopy

EQU: Exame Qualitativo de Urina

HIV: Human immunodeficiency virus

JCV: JC vírus

MMF: Micofenolato mofetil

PCR: Polimerase chain reaction

PVN: Polyomavirus nephropathy

SV40: Simian virus 40

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA	10
1 Introdução.....	11
1.1 Poliomavírus.....	11
1.2 Nefropatia por Poliomavírus (PVN).....	12
1.3 Fatores de risco.....	13
1.4 Diagnóstico da PVN.....	14
1.5 Pesquisa de células decoy.....	16
1.6 Tratamento.....	19
1.7 Prognóstico.....	20
2 Justificativa.....	21
3 Objetivos.....	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4 Referências bibliográficas.....	23
CAPÍTULO II - Artigo científico.....	27
Conclusão.....	44
Anexos.....	45

Capítulo I – REVISÃO DA LITERATURA

1 INTRODUÇÃO

1.1 Poliomavírus

A família Polyomaviridae inclui três membros: o JC vírus (JCV), o simian vírus 40 (SV40) e o BK vírus (BKV) [1,2]. Tratam-se de vírus com estrutura molecular muito semelhante, medindo 40 nm de diâmetro e que possuem genoma circular de 5,1-kb, composto de DNA dupla fita. Enquanto o SV40 é comumente encontrado em macacos, sendo de pouco significado em humanos, o JCV é um importante causador de doença neurológica em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), agente de leucoencefalopatia progressiva multifocal [3]. Diferentemente do BKV, nenhum dos demais poliomavírus têm sido associados de modo consistente com nefropatia pós-transplante renal.

As primeiras poliomavíroses, causadas por BKV e por JCV, foram coincidentemente isoladas em 1971 por dois grupos independentes: o BKV em urina de um paciente transplantado renal e o JCV do tecido cerebral de um paciente com linfoma de Hodgking [4]. Classicamente, a infecção primária por BKV acontece na infância, sendo muito comum, variando desde casos assintomáticos até sintomas sugestivos de um simples resfriado [5,6]. A transmissão ocorre primariamente por via oral ou respiratória, sendo também possível adquirir o vírus através de transfusões sanguíneas, transplantes ou mesmo por via transplacentária [7]. Após a infecção primária, em indivíduos imunocompetentes, o vírus entra em um período de latência com tropismo pelo trato urinário (células tubulares renais, cápsula de Bowman e células uroteliais) [5,6,8]. Recentemente foi evidenciada uma associação entre a presença de hematúria assintomática e infecção urinária por poliomavírus em pacientes imunocompetentes [9].

A soroprevalência para o BKV e para o JCV nos adultos é muito alta: mais de 90% da população adulta é soropositiva para o BKV, enquanto que 50 a 80% dos adultos tem anticorpos para o JCV. Em indivíduos imunocompetentes não causam patologia, porém, em indivíduos imunocomprometidos as poliomavíroses humanas causam doença primária significativa, permitindo a reativação de um estado subclínico persistente para

uma infecção lítica, resultando em virúria e viremia, potencialmente podendo conduzir a doença severa ou fatal [4]. Para o BKV, a reativação é mais comum em pacientes que receberam transplante de medula e em pacientes que receberam transplante renal, onde a infecção lítica do BKV resulta em cistite hemorrágica e em nefropatia por poliomavírus, respectivamente. Ano passado, pela primeira vez foi reportado que a replicação do BKV nos pacientes receptores de transplante renal tem origem no doador. A urina de 249 pares doador/receptor foi investigada para a presença de DNA de BKV por qPCR antes do transplante e consecutivamente depois do transplante [10]. A reativação tem sido observada em indivíduos com condições imunes alteradas, incluindo pacientes com HIV [4], transplantados de órgãos sólidos [11] e doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico. Esta última condição foi referenciada pelo nosso grupo, sendo demonstrada pela detecção das células decoy, pela primeira vez na literatura médica, e comprovada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) [12].

1.2 Nefropatia por poliomavírus (PVN)

A PVN tem se tornado um problema emergente na população de receptores de transplante renal [13,14]. Com prevalência elevada e sem tratamento específico, pode levar à perda precoce do enxerto com grande morbidade, fazendo com que o paciente retorne a programas de terapia de substituição renal, o que eleva os custos do tratamento. Isto tem sido motivo de estudo em centros transplantadores de todo o mundo. A virúria e a viremia causadas por BKV, decorrentes da reativação, são encontradas em 80% dos pacientes de transplante renal e 10% destes pacientes progridem para PVN, resultando em perda do enxerto em 90% das vezes [4]. A PVN é caracterizada por necrose dos túbulos proximais e desnudação da membrana basal como resultado da ação lítica da infecção pelo BKV nas células epiteliais renais [4]. Com a introdução de novos e mais potentes regimes de imunossupressão, a incidência de PVN tem aumentado [4], indicando uma relação entre a reativação do BKV e o rompimento do sistema imune.

A prevalência de nefropatia associada ao BKV está em torno de 2-8% [15-19]. Após o diagnóstico da PVN, cerca de 50% dos pacientes evoluem para

perda progressiva de função do enxerto renal em 2 anos [16-20], com necessidade de retorno à terapia renal substitutiva. Um estudo retrospectivo e comparativo demonstrou sobrevida média do enxerto de 47,8 meses e 88,7 meses, respectivamente, para pacientes com e sem presença de PVN [16]. Na ausência de intervenções, a perda do enxerto é evidenciada em 45% dos casos após 6 meses do diagnóstico [21]. O diagnóstico precoce da replicação viral permite intervenção terapêutica com redução do risco de desenvolvimento da doença e, por conseguinte, da perda de enxerto [18,20,22].

Desde 1995 que a PVN vem sendo reconhecida como uma causa significativa de disfunção dos rins transplantados com consequente perda do enxerto. Ela em geral ocorre de 2 a 60 meses depois do transplante, mas é mais frequentemente identificada dentro do primeiro ano pós-transplante.

1.3 Fatores de risco

Os fatores de risco para desenvolvimento de infecção por BKV não são totalmente compreendidos. Enquanto estudo envolvendo crianças demonstrou maior risco de nefropatia por BKV em receptores soronegativos, que receberam rins de doadores soropositivos [23], Hirsch e colaboradores demonstraram que 85% dos pacientes com nefropatia por BKV apresentavam sorologia positiva pré-transplante [15]. Pacientes do sexo masculino e com idade avançada apresentam maior incidência de nefropatia por BKV [16]. O uso de *stents* ureterais tem sido associado com a ocorrência de virúria persistente por BKV [24]. Outros fatores relacionados ao receptor, tais como variáveis demográficas e imunológicas, bem como tempo de isquemia e a função inicial do enxerto, não parecem se associar com risco aumentado para desenvolvimento da nefropatia por BKV [2,25].

A introdução de novos agentes imunossupressores, tais como micofenolato mofetil (MMF) e tacrolimus, tem demonstrado relação temporal com a ocorrência de nefropatia por BKV. Uma incidência aumentada da doença tem sido descrita em pacientes recebendo esquema imunossupressor triplice com MMF, tacrolimus e prednisona [26], o que não tem sido observado em todos os estudos [25]. Já o uso de anticorpos policlonais para terapia de indução não teve associação com presença de células decoy ou nefropatia por

BKV [15]. Embora o uso de novas medicações imunossupressoras tenha sido implicado como fator associado ao aumento na incidência de nefropatia por BKV, o principal fator determinante ainda é desconhecido, uma vez que a infecção é diagnosticada em receptores que nunca usaram esquemas imunossupressores potentes, assim como em pacientes em uso de sirolimo e em esquemas livres de corticosteróides [2].

Marcadores não invasivos como as células decoy, virúria e viremia e anticorpos séricos contra o BKV podem ser úteis como marcadores adjuvantes para o diagnóstico da PVN e marcadores para o monitoramento da replicação do BKV e a resposta da PVN a intervenções terapêuticas. Entretanto a redução da imunossupressão deve ser balanceada contra riscos inerentes de rejeição. Em casos onde a rejeição se apresenta simultaneamente com PVN ou ocorre depois do diagnóstico da PVN, um procedimento em duas etapas é recomendado consistindo de um aumento inicial da imunossupressão para tratar o episódio de rejeição, seguido de uma diminuição da imunossupressão. Atualmente, não existem drogas efetivas não nefrotóxicas para o tratamento antiviral para a PVN [27].

1.4 Diagnóstico da PVN

O padrão atual de diagnóstico da PVN inclui a análise de biópsias renais usando histopatologia ou imunohistoquímica, tanto para detectar mudanças citopáticas como resultado de injúria ou de lise das células epiteliais tubulares renais, ou para detectar a expressão genética do vírus. Também é utilizada a avaliação da citologia urinária para detectar a presença de células decoy, que são células epiteliais com corpos de inclusão viral intranuclear, e PCR para detectar os genomas virais e quantificar a liberação viral nas amostras de sangue ou de urina [4]. O PCR e a citologia urinária são especialmente úteis para detectar os estágios iniciais de reativação e PVN, pois permitem diagnósticos e intervenções rápidas, com um consequente aumento da sobrevida do transplantado [4].

A técnica do PCR em tempo real permite diagnosticar e quantificar genomas de BKV em células humanas de sangue periférico de maneira rápida e acurada, com alta sensibilidade e especificidade [6], de forma não invasiva,

sendo um novo instrumento no diagnóstico de PVN. Ainda hoje, tal metodologia possui custo elevado para sua inserção em massa como rotina diagnóstica na suspeita de infecção por BKV. Embora os testes moleculares sejam hoje mais amplamente disponíveis, é necessário que se determinem os valores de ponto de corte utilizados para prever o risco de desenvolvimento de nefropatia associada ao vírus, indicando o melhor momento para o início do tratamento da infecção antes que se instale dano tecidual renal irreversível. Em um estudo piloto, foi demonstrado que virúria e viremia por BKV foram documentados em 62% e 42% dos pacientes transplantados renais evidenciando disfunção do enxerto renal [28]. Neste estudo, que empregou técnica de PCR semi-nested, a presença (qualitativa) de virúria intensa (+++) foi associada com maior probabilidade de viremia por BKV. Em trabalho realizado por nosso grupo testando dois protocolos diferentes de extração de DNA viral, um analisando a amostra de urina total e outro analisando o sedimento urinário observamos que existiu uma diferença estatisticamente significativa na quantidade de DNA viral detectada no sedimento urinário, comparado com a urina total, o que demonstra uma maior capacidade de detecção do patógeno quando se utiliza este procedimento pré-analítico [29]. Uma vez que testes quantitativos de PCR em tempo real se encontram agora disponíveis, é preciso definir com maior exatidão o ponto de corte de virúria e de viremia que possam prever a presença de nefropatia por BKV. A detecção de virúria através do método qualitativo de PCR é observada em 30-40% dos receptores de transplante renal [15], sendo um exame com excelente valor preditivo negativo, mas com valor preditivo positivo baixo (40%); é considerado também, um bom teste de rastreamento [2]. A detecção da presença de BKV no plasma, utilizando técnica de PCR é útil ao diagnóstico, precedendo a ocorrência de PVN [2,7].

A análise por imunohistoquímica pode ser realizada em secções de tecido obtidos de biópsia, fixados em formalina e conservados em parafina usando anticorpos comercialmente disponíveis para detecção do antígeno SV40 que é comum para o JCV, BKV e SV40 [30].

A PVN desenvolve-se, em geral, no final do primeiro ano do transplante, com média entre 10-16 meses [15,16,25]. A presença do vírus na urina, demonstrada por citologia urinária (observação de células decoy) e do DNA viral, precede em aproximadamente 4 semanas o diagnóstico da viremia e

em 12 semanas a confirmação histológica [15]. Portanto, métodos diagnósticos que permitam a identificação precoce de pacientes em risco de desenvolver doença por BKV devem ser utilizados, devido à possibilidade da administração de intervenções terapêuticas precoces que visem à manutenção da função do enxerto.

1.5 Pesquisa de células decoy

A presença de células decoy pode ser um achado de relevância diagnóstica para indicar a reativação do poliomavírus. Usualmente as mesmas são identificadas por coloração de Papanicolaou em urina fixada, tanto em esfregaços de amostra total quanto em amostras citocentrifugadas [19,31]. Em estudo recente foi evidenciado que a pesquisa de células decoy através da citologia urinária demonstrou ser um método não invasivo de grande utilidade para o diagnóstico de nefropatia pelo poliomavírus BK, chegando a encontrar especificidade de 99,7% [32]. Os resultados obtidos em um trabalho publicado por pesquisadores da UFCSPA, conduzido na Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, indicaram 84,6% de sensibilidade para as células decoy quando comparadas com os resultados das biópsias renais [33]. Pela coloração de Papanicolaou (Figura 1), muitas células decoy mostram um núcleo muito aumentado, que é ocupado por uma inclusão basofílica rodeada pela cromatina, que confere uma aparência de campo vítreo ou gelatinosa. Algumas vezes a inclusão nuclear tem um aspecto vesicular, ou pode ser rodeada por um halo, e a cromatina estar aderida a ele [19,31]. Quando as células decoy derivam do uroepitélio, um núcleo muito aumentado e alterado, assim como a forma irregular do corpo da célula podem mimetizar as mudanças observadas em células neoplásicas [19,31].

Na análise do sedimento urinário por microscopia de contraste de fase (Figura 2) [31], as células decoy mostram as mesmas anormalidades descritas pelos espécimes corados pelo método de Papanicolaou, isto é, aumento do núcleo com uma aparência de campo vítreo ou vesicular, cromatina alterada, nucléolos aumentados, a presença de um halo, e, as vezes, também vacúolos citoplasmáticos. Estas características fazem as células decoy diferentes das

células epiteliais tubulares e transicionais, encontradas em todas as outras condições.

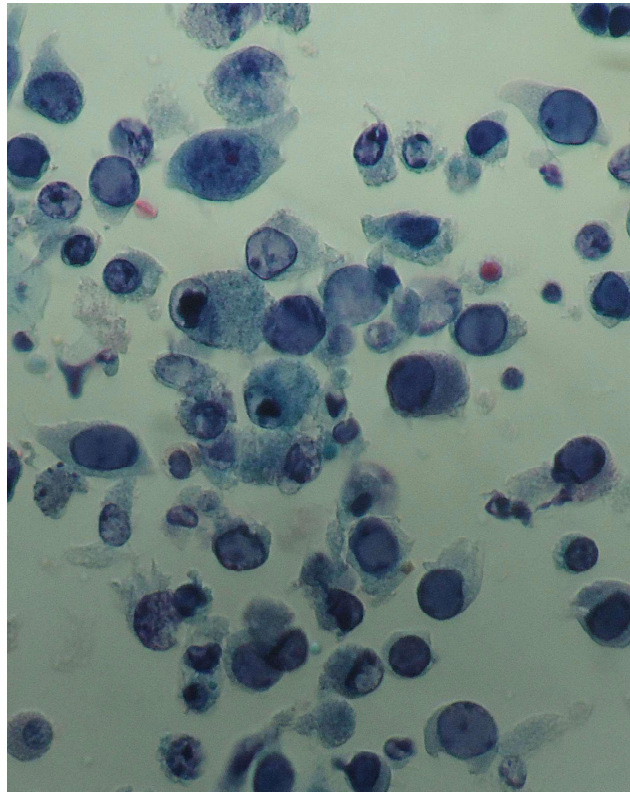


Figura 1 – Células decoy coradas por Papanicolaou (400x).



Figura 2 – Célula decoy vista em microscopia de contraste de fase (400x).

Poucos laboratórios de análises clínicas possuem microscópios equipados com filtros para contraste de fase, recurso considerado dispendioso

na maioria das vezes, devido a pouca valorização que é dada para o Exame Qualitativo de Urina (E.Q.U.) em muitos centros. Pela primeira vez no Brasil, conseguimos comprovar a possibilidade de identificação das células decoy no sedimento urinário de amostras de pacientes que realizam exames no setor de Uroanálise do Laboratório Central de Análises Clínicas da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA) e, de maneira inédita na literatura, o fizemos utilizando microscopia óptica de campo claro sem utilizar qualquer coloração [34].

Uma situação de importância para a literatura médica no contexto da nefrologia e mais especificamente da uroanálise, é que antes de 2009 não se encontravam livros com imagens de células decoy em sedimento urinário não corado, fato que começou a mudar neste ano com a publicação do livro do Dr. Giovanni B. Fogazzi “The urinary sediment – an integrated view” [35] onde são apresentadas imagens de células decoy em sedimento urinário vistas por microscopia de contraste de fase. Em 2012, Dr. Fogazzi publicou o livro “The urinary sediment by sediMAX” [36] apresentando imagens das células decoy obtidas através da utilização deste equipamento que realiza análise automatizada do sedimento urinário por obtenção de imagens e de um software de reconhecimento dos elementos. Ano passado Dr. Mark A. Perazella em conjunto com Dr. Robert F. Reilly Jr. publicaram o livro “Nephrology in 30 days” [37] onde entre outras imagens consta uma de uma célula decoy vista em sedimento urinário não corado através de microscopia de campo claro. Esta imagem que consta neste livro foi obtida no Laboratório Central de Análises Clínicas da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

As amostras de urina dos pacientes transplantados renais são um desafio a parte para os microscopistas que atuam em laboratórios de análises clínicas que atendem este perfil de pacientes. São necessárias inúmeras horas de treinamento para que um profissional esteja apto a conduzir uma análise segura que possibilitará, por exemplo, alertar ao médico assistente para uma possível reativação do BKV. A facilidade e simplicidade do exame comum de urina não podem jamais levar o profissional ao relaxamento dos padrões de qualidade necessários para a obtenção de resultados fidedignos. O maior prejuízo que um profissional de análises clínicas que realiza análise de sedimento urinário pode causar é deixar de fornecer uma informação

cl clinicamente útil ou classificar determinado elemento erroneamente. O foco principal deste trabalho é apresentar esta célula para estes profissionais que se deparam diariamente com este elemento (Ex.: no Laboratório Central de Análises Clínicas – Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, de 1 a 5 pacientes dos aproximadamente 70 receptores de transplante renal que comparecem aos postos de colheita do laboratório apresentam células decoy nos sedimentos urinários) e precisam ter o conhecimento adequado para fornecer uma informação correta. Desta forma, este tipo de célula é um achado de rotina para os profissionais do Laboratório Central justificando a condução deste trabalho para padronização do procedimento de pesquisa das células decoy.

1.6 Tratamento

O manejo da infecção por BKV tem como objetivo reduzir a replicação viral, evitar episódios de rejeição aguda associada à infecção e preservar a função renal. A reversão da imunossupressão é a estratégia utilizada com maior frequência neste contexto, permitindo ao sistema imune hospedeiro combater a infecção viral [24,18]; tais medidas podem, no entanto, implicar em aumento do risco de rejeição aguda [16]. Sabe-se que a redução da imunossupressão estabiliza a função renal de transplantados com nefropatia por BKV, reforçando-se a importância de se estabelecer um diagnóstico precoce para esta condição [25,38].

O tratamento farmacológico da nefropatia por BKV envolve o uso de drogas que reduzam a carga viral do BKV. O tratamento com leflunomida, associado à redução da imunossupressão, demonstrou importante redução na viremia e virúria [39]. Cidofovir tem sido utilizado no tratamento da infecção; no entanto, este agente é nefrotóxico e excretado pelo rim, necessitando-se maiores cuidados relacionados a hidratação do paciente [40]. Imunoglobulina humana e ciprofloxacino são descritos como opções terapêuticas [41,42]. Estudos prospectivos e randomizados são ainda necessários para que se defina a eficácia das terapias atualmente empregadas para nefropatia por BKV. A prevenção da nefropatia por BKV através do monitoramento da carga viral por PCR e da pesquisa de células decoy em sedimento urinário pode ser uma importante abordagem, permitindo o diagnóstico precoce de pacientes em risco

para desenvolver a doença e oportunizando intervenção terapêutica antes da lesão renal ser estabelecida, preservando a função do enxerto. Estudos de Brennan e Hussain, com seus respectivos colaboradores, demonstraram que a redução precoce da imunossupressão em pacientes com viremia por BKV foi eficiente e segura em prevenir o aparecimento de nefropatia por este poliomavírus [24,43]. Em crianças, há evidências de que a avaliação seriada de viremia e virúria, com redução da imunossupressão em pacientes virêmicos, foi eficaz em reduzir o risco de desenvolvimento de nefropatia por BKV, sem aumento do risco de rejeição aguda [23].

1.7 Prognóstico

Após o diagnóstico da nefropatia por BKV, em torno de 50% dos pacientes evoluem para perda progressiva de função do enxerto renal, ao longo de dois anos de seguimento [16-20] com necessidade de retorno a terapia renal substitutiva. Um estudo retrospectivo demonstrou sobrevida média do enxerto de 48 meses e 89 meses, respectivamente, para pacientes com e sem presença de nefropatia por BKV [16]. Na ausência de qualquer intervenção, a perda do enxerto é evidenciada em 45% dos casos após seis meses do diagnóstico [21]. A determinação precoce da replicação viral permite intervenção terapêutica, com redução do risco de desenvolvimento da doença e, conseqüentemente, da perda de enxerto [18,20,23,38].

A possibilidade de fornecer a informação da presença do BKV através da observação das células decoy em um exame simples, pouco oneroso financeiramente, com amostra de fácil obtenção faz com que este novo parâmetro além de auxiliar os pacientes transplantados renais agregue um valor inestimável ao (E.Q.U.), um exame muito utilizado em todos os países para triagem de pacientes, mas, que é muito subestimado quanto à relevância de seus resultados. Permite também que se crie uma pesquisa específica para células decoy, se esta for a necessidade julgada pelo médico assistente. Devido à possibilidade de se conseguir um dado precoce sobre a infecção pelo BKV, esta análise pode atuar como uma fonte de informação útil para auxiliar na prevenção do desenvolvimento da PVN, e em pacientes transplantados, atuar precocemente na prevenção da perda ao enxerto.

2 JUSTIFICATIVA

O transplante renal é a modalidade terapêutica de escolha para o manejo de pacientes com insuficiência renal em estágio terminal. Nos anos recentes, a importância do BKV como agente de disfunção do enxerto ganhou grande notoriedade na literatura médica. Isto pode ser exemplificado pela frequência com que ocorre reativação de BKV latente após o transplante de rim, bem como pela elevada proporção de pacientes que perdem o enxerto uma vez que nefropatia por BKV ocorra. Frente ao exposto acima e considerando a importância do diagnóstico precoce da reativação do poliomavírus na população de transplantados renais, sugerimos a realização deste trabalho a fim de difundir a possibilidade de utilização de uma metodologia simples, barata e rápida com excelente resultado final para detecção deste patógeno oportunista. Esta metodologia inovadora trará grande benefício para a população considerável de transplantados renais que o complexo hospitalar da ISCMPA assiste.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Validar a técnica de pesquisa de células decoy utilizando a microscopia óptica convencional para auxiliar no diagnóstico de PVN.

3.2 Objetivos específicos

- Validar os dados obtidos através da microscopia óptica convencional em comparação com os dados da pesquisa de células decoy através do uso da coloração de Papanicolaou e da imunoistoquímica (biópsia renal);
- Descrever as características morfológicas das células decoy observadas em microscopia óptica convencional;
- Realizar avaliação quantitativa de células decoy em urina e relacionar com parâmetros de imunossupressão;
- Correlacionar os testes de citopatologia urinária (células decoy) com a detecção quantitativa de DNA de BKV na urina e no sangue, através da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real;
- Avaliar o tempo médio de aparecimento de células decoy, pós-transplante renal;
- Determinar a taxa de incidência de PVN em pacientes transplantados renais da ISCMPA para o período do estudo, avaliando fatores de risco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- MAJOR ED et al. **Human Polyomaviruses**. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Eds. Manual of Clinical Microbiology, 9th Ed. Washington DC: ASM Press, 2010. Pag 1612-30.
- 2 - HARIHARAN S. BK virus nephritis after renal transplantation. **Kidney Internat**. 2006; 69:655-62.
- 3- PASQUALOTTO AC, DE MATTOS AJ, ROCHA MM. Progressive multifocal leukoencephalopathy confirmed by PCR for JC vírus in L. Case report. **Arq Neuropsiquiatr**. 2004; 62:550-4.
- 4 - JIANG M et al. The role of polyomaviruses in human disease. **Virology**. 2009;38:266-73.
- 5 - RANDHAWA P et al. BK Virus: Discovery, Epidemiology and Biology. **Graft**. 2002; 5:s19-27.
- 6 - XIAOLI LP et al. Monitoring of Polyomavirus BK Virus Viruria e Viremia in Renal Allograft Recipients by Use of a Quntitative real-Time PCR Asay: One-year Prosetive Study. **J Clin Microbiol**. 2007; 45:3568-73.
- 7 - HIRSCH HH, STEIJER J. Polyomavirus BK. **Lancet Infect Dis**. 2003;3(10):611-23.
- 8 - AGHA I, BRENNAN DC. BK Virus and Current Imunosuppressive Therapy. **Graft**. 2002; 5:s65-72.
- 9- LEE SH et al. Asymptomatic hematuria associated with urinary polyomavirus infection in immunocompetent patients. **J Med Virol**. 2014; 86(2):347-53.
- 10 - SCHMITT C et al. Donor origin of BKV replication after kidney transplantation. **J Clin Virol**. 2013 Dec 1. pii: S1386-6532(13)00505-2. doi: 10.1016/j.jcv.2013.11.009.
- 11- KROTH LV et al. Prevalence of urinary decoy cells and associated risk factors in a Brazilian kidney, pancreas, and kidney-pancreas transplant population. **Transplant Proc**. 2012; 44(8):2394-6.
- 12- POLONI JAT et al. Decoy cells due to polyomavirus BK infection in the urine sediment of a patient with lupus nephritis. **Lupus**. 2013; 22(14):1547-8.

- 13 - KIM YJ et al. Impact of Combined Acute Rejection on BK Virus-Associated Nephropathy in Kidney Transplantation. **J Korean Med Sci.** 2013 Dec;28(12):1711-5.
- 14 - JACOBI J et al. BK viremia and polyomavirus nephropathy in 352 kidney transplants; risk factors and potential role of mTOR inhibition. **BMC Nephrol.** 2013; 14:207.
- 15 - HIRSCH HH et al. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. **N Eng J Med.** 2002; 347:488-96.
- 16 - RAMOS E et al. Clinical course of polyoma virus nephropathy in 67 renal transplant patients. **J Am Soc Nephrol.** 2002; 13:2145-51.
- 17 - NICKELEIT V et al. Polyomavirus infection of renal allograft recipients:from latent infection from manifest disease. **J Am soc Nephrol.** 1999;10(5):1080-9.
- 18 – HIRSCH HH et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. **Transplantation.** 2005; 79(10):1270-86.
- 19 - DRACHEMBERG CB et al. Human polyomavirus in renal allograft biopsies: morphological findings and correlation with urine cytology. **Hum Pathol.** 1999; 30(8):970-7.
- 20 - DRACHEMBERG CB et al. Histological patterns of polyomavirus nephropathy: correlaction with graft outcome and viral load. **Am J Transplant** 2004; 4:2082-92.
- 21 – NICKELEIT V et al. BK-virus nephropathy in renal transplants-tubular necrosis, MHC-class II expression and rejection in a puzzling game. **Nephrol Dial Transplant.** 2000; 15(3):324-32.
- 22 - GINEVRI F et al. Prospective monitoring of polyomavirus BK replication and impact of pre-emptive intervention in pediatric kidney recipients. **Am J Transplant.** 2007; 7:2727-35.
- 23- SMITH JM, et al. Polyomavirus nephropathy in pediatric kidney transplant recipients. **Am J Transplant.** 2004; 4: 2109-17.
- 24- BRENAMM DC, et al. Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. **Am J Transplant.** 2005; 5: 582-94.

- 25- VASUDEV B et al. BK Virus nephritis: risk factors, timing and outcome in renal transplant recipients. **Kidney Int.** 2005;68(4):1834-39.
- 26- MENGEL M, et al. Incidence of polyomavirus-nephropathy in renal allografts: influence of modern immunosuppressive drugs. **Nephrol Dial Transplant.** 2003; 18: 1190-6.
- 27 - TROFE J et al. Polyomavirus nephropathy in kidney transplantation. **Prog Transplant.** 2004;14(2):130-40; quiz 141-2.
- 28- MONTAGNER J et al. BKV-infection in kidney graft dysfunction. **Braz J Infect Dis.** 2010; 14:170-4.
- 29- PINTO GG et al. Evaluation of different urine protocols and DNA extraction methods for quantitative detection of BK viruria in kidney transplant patients. **J Virol Methods.** 2013;188(1-2):94-6.
- 30 - NICKELEIT V, STEIGER J, MIHATSCH MJ. BK virus infection after kidney transplantation. **Graft.** 2002; 5; 46: S46-S57.
- 31 – 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.
- 32 - HUANG G et al. Noninvasive tool for the diagnosis of polyomavirus BK-associated nephropathy in renal transplant recipients. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2013; 75(3):292-7.
- 33 - RANZI AD et al. The role of urine cytology for 'decoy cells' as a screening tool in renal transplant recipients. **Acta Cytol.** 2012; 56(5):543-7.
- 34 - POLONI JAT, BRUNO RM, VOEGELI CF. Common digital camera and urinary sediment analysis: a tool to be explored. **NDTPlus.** 2011; 4(6):455-6.
- 35 - FOGAZZI GB. **The urinary sediment – an integrated view.** Third edition. Milano, Elsevier-Masson 2009.
- 36 - FOGAZZI GB. **The urinary sediment by sediMAX.** First edition. Milano, Elsevier-Masson 2012.
- 37 - PERAZELLA MA and REILLY JR. RF. **Nephrology in 30 days.** Second edition. New York, Lange 2013.

- 38- SCHAUB S, et al. Reducing immunosuppression preserves allograft function in presumptive and definitive polyomavirus-associated nephropathy. **Am J Transplant.** 2010; 10:2615-23.
- 39- WILLIAN JW, et al. Leflunomide for polyomavirus type BK nephropathy. **N Eng J Med.** 2005; 352:1157-8.
- 40- KUYPERS DR, et al. Adjuvant low-dose cidofovir therapy for BK polyomavirus interstitial nephritis in renal transplant recipients. **Am J Transplant.** 2005; 5:1997-2004.
- 41- SENER A, et al. Intravenous Immunoglobulin as a treatment for BK virus-associated nephropathy: one-year follow-up of renal allograft recipients. **Transplantation.** 2006; 81:117-120.
- 42- LEUNG AY, et al. Ciprofloxacin decreased polyoma BK virus load in patients who underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Clin Infect Dis.** 2005;40: 528-37.
- 43- HUSSAIN S, et al. Prevention of BK nephritis by monitoring BK viremia in renal transplant recipients: a prospective study. **Graft.** 2004;7:28-30.

Capítulo II – ARTIGO CIENTÍFICO

Diagnostic utility of bright field microscopy to detect decoy cells due to polyomavirus BK infection in the fresh and unstained urine sediment on kidney allograft recipients[#]

José Antonio Tesser Poloni(1,2*), Gabriel Godinho Pinto(3), Maria Solange Bressan Giordani(1), Alessandro Comarú Pasqualotto(2,3), Elizete Keitel(2,4), Giovanni Battista Fogazzi(5), Carlos Franco Voegeli(1), Nadiana Inocente (2) and Liane Nanci Rotta(2)

- 1- Central Laboratory of Clinical Analysis – Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre – Brazil.
- 2- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre – Brazil.
- 3- Molecular Biology Laboratory – Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre – Brazil.
- 4- Nephrology Unit - Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre – Brazil.
- 5- Research Laboratory on Urine Microscopy – Ospedale Maggiore, Milano – Italy.

Artigo a ser submetido à revista Nephrology Dialysis Transplantation

* Corresponding author: José Antonio Tesser Poloni, Sarmento Leite, 245, CEP: 90.050-170, Porto Alegre/RS, Brasil, e-mail: jatpoloni@yahoo.com.br Phone: +55 51 3303 8836

Abstract

Background: Polyomavirus BK (BKV) is an important pathogen that can be reactivated on kidney allograft recipients leading to BKV nephropathy, an important cause of graft loss. Decoy cells are one of the hallmarks of BKV reactivation and are possible to identify in the urine sediment.

Methods: A cohort of 102 patients was accompanied during months 3 and 6 after the kidney transplant procedure. Blood and urine samples were collected to determine the presence of BKV. Urine samples were evaluated to identify the presence of decoy cells in the fresh and unstained urine sediment under bright field microscopy and by Papanicolaou stain. Also BKV viruria was performed by PCR. Blood samples were analysed to evaluate BKV viremia and to determine Tacrolimus levels. Immunohistochemistry of the kidney biopsy was also conducted to identify BKV nephropathy.

Results: Decoy cells were found on 15 patients on the evaluated months and BKV nephropathy in 4 patients. There was agreement ($P < 0,001$) between the results observed in the unstained urine sediment analysed by bright field microscopy and the results obtained by Papanicolaou stain, BKV viruria and viremia. Bright field microscopy sensitivity and specificity, compared to gold standard (immunohistochemistry of the kidney biopsy) were 80% and 52%, respectively.

Conclusions: Bright field microscopy of the unstained urine sediment is a reliable, fast and cheap method to identify decoy cells due to BKV infection in the population of kidney allograft recipients.

Key words: Decoy cells, Polyomavirus BK, Urine sediment, Bright field microscopy

Introduction

Polyomavirus BK (BKV) is a DNA virus that infects up to 90% of the adult population [1]. After initial exposure in childhood, the virus becomes latent in urothelial tissues [2]. In immunosuppressed patients, actually using new and more potent immunosuppressive regimens, loss of functional antiviral immunity can result in uncontrolled viral reactivation, which can lead to BK nephropathy [3]. Prompt detection of reactivation can improve outcomes and is the basis for recommending routine surveillance after transplantation [4]. During reactivation, viruria occurs with exfoliation of urinary epithelial cells containing intranuclear BKV viral particles, known as “decoy cells” [5]. These are not specific for BKV infection, but are widely used as a screening test [6]. It is not known at what level of decoy cell shedding that BKV viruria becomes predictive of viremia or clinical BK nephropathy.

In some transplant recipients, BKV replication advances to involve the renal tubular epithelia. Infection may progress to disrupt the tubular basement membrane and this may be the route of access to the blood stream. The progression appears to be viral activation, uroepithelial replication, renal tubular infection and replication, viremia, and clinical nephropathy [7]. Screening tests for BKV infection include decoy cell identification, urine PCR, qualitative and quantitative whole blood PCR determination of BKV DNA, urine electron microscopy, and allograftbiopsy. Once diagnosed with BKV nephropathy, between 16% and 50% of transplant recipients will lose the graft [8]. Decoy cells found in voided urine samples contain intranuclear (mainly BK virus) inclusions that appear as homogenous and glassy viral material on standard light microscopy of the stained urine sediment. Decoy cells can easily be identified and counted by cytopathologists in standard Papanicolaou- stained urine cytology specimen using cytospin preparation. In 2001 Fogazzi et al. described for the first time the identification of decoy cells in the urine sediment of a kidney transplantation recipient using phase-contrast microscopy [9]. Our group reported that decoy cells can also be detected in the urine sediment of kidney transplant patients by the means of bright field microscopy without any special stain [10]. Since bright field microscopy is the main technology used to conduct urinalysis in large clinical analysis laboratories the present study was conducted

to evaluate the diagnostic utility and validation of this basic technology to identify decoy cells due to BKV in the fresh and unstained urine sediment of kidney allograft recipients.

Subjects and Methods

Study Population

From April 2012 to March 2013, we enrolled 102 patients > 18 year-old (58 males and 44 females) kidney allograft recipients (cadaveric or living donor) at the Post Transplant Unit of Dom Vicente Scherer Hospital – Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre/RS - Brazil. An informed consent form was signed by each patient at the time of collection. The study was approved by the Ethics Committee of the Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre and by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Clinical Specimens Collection and Processing

This study was carried out on a total of 204 urine samples and 204 blood samples, collected from a cohort of 102 adult renal allograft recipients at the month 3 and month 6 after the transplantation procedure. All the urine and blood samples were collected in the Central Laboratory of Clinical Analysis – Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre and immediately sent to the Urinalysis sector.

Urine sample collection: According to the standardized procedure performed in our center, the patients were asked to furnish the midstream of the first morning urine. The patients received clear instructions on hygiene of the hands and external genitalia in order to minimize contamination. All patients collected the urine samples on sterile containers furnished by the laboratory. Urine samples were divided in the Urinalysis sector in three parts of approximately 10 mL each, to urine sediment analysis to decoy cells research), to viruria determination (Molecular Biology Laboratory) and to Papanicolaou stain of the urine sediment (Pathology Laboratory).

Blood sample collection: Following the standardized procedure performed in our center, all the blood samples were collected by venipuncture using the

Vacurette® blood collection system. Approximately 5 mL of whole blood was collected in a EDTA tube, mixed and immediately sent to the Molecular Biology Laboratory for viremia determination.

Decoy cells research by bright field microscopy in the fresh and unstained urine sediment

In a urinalysis standard conic tube 10mL of urine was centrifuged at 1500 rpm/ 5 minutes. The supernatant was removed until the mark of 0.5 mL using a Pasteur pipete. The urine sediment was homogenized using the same Pasteur pipete. Twenty µL of the urine sediment was transferred to a slide and covered with a coverslip of 22 x 22mm. The sample was analysed by two experienced urine microscopists (Analyst 1- JATP and Analyst 2 - MSBG) counting the elements on 50 field using the 400x magnification lens (high power field) in a Zeiss microscope (Axiostar model, Germany).

Decoy cells research by bright field in the urine sediment stained by Papanicolaou

An aliquot of 10mL was centrifuged in 1300 rpm/10 min and the pellet was cytocentrifuged (cytospin) in 800 rpm/ 6 min, and two smears were subjected to Papanicolaou staining. The whole circular area of the cytospin (5 mm diameter) was screened at the microscopical enlargement of 200x for the presence of decoy cells. All urine cytology examinations were evaluated by the same cytopathologist [11].

Viruria and viremia determination

Samples were collected and shipped to the Molecular Biology Laboratory where they were refrigerated at 4 °C until processed for DNA extraction.

Urine: DNA was extracted on the same day of sample collection by using the commercial kits QIAmp DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). In a sterile falcon tube 10 mL of homogenized urine was centrifuged at 3500rpm/10 min. The supernatant was discarded and a pellet of 140 µL was used as recommended by the manufacturer.

Blood: DNA was extracted on the same day of sample collection by using the commercial kits QIAmp DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Hilden,

Germany). The tubes containing 5 mL of whole blood were centrifuged at 3500 rpm/10 min.

Extracted DNA samples for water quantitative polymerase chain reaction (qPCR) testing. The CPE-DNA Internal Control (Nanogen, Buttiglieria Alta, Italy) was added in each of the extracted DNA samples, as recommended by the manufacturer. The internal control was the human β -globin gene, which was amplified simultaneously with the target sequence. BKV DNA detection was performed by qPCR using a commercial kit (BKV Q-PCR Alert Ampliprobe, Nanogen, Buttiglieria Alta, Italy) in a 7500 thermal cycler qPCR System (Applied Biosystems). The following cycling steps were used: pre-holding stage 2 min at 50 °C, initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles of 95 °C for 1 min and 60 °C for 1 min. The standard curve for this quantitative amplification assay was obtained using BKV Q-PCR Standard (Nanogen, Buttiglieria Alta, Italy), containing four known concentrations of BKV DNA (10^2 – 10^5 plasmid copies in 10-fold dilution steps). Results were read by comparing the cycle threshold (Ct) from the unknown sample with the standard controls. In addition to the positive controls, in every run a negative BKV control as well an internal control was added to the reaction [12].

Renal biopsy: The biopsies were performed by clinical indication. All samples were evaluated by a single pathologist and then stained with hematoxylin and eosin for immunohistochemical confirmation. Only biopsies performed within 45 days of (before or after) the urine cytology examination were considered valid. All renal biopsies were evaluated by the same pathologist [11].

Tacrolimus analysis in whole blood: We used the chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA), in a Architect i2000SR (Abbot, Germany). The analysis was conducted in the Central Laboratory of Clinical Analysis – Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

Statistical Analysis