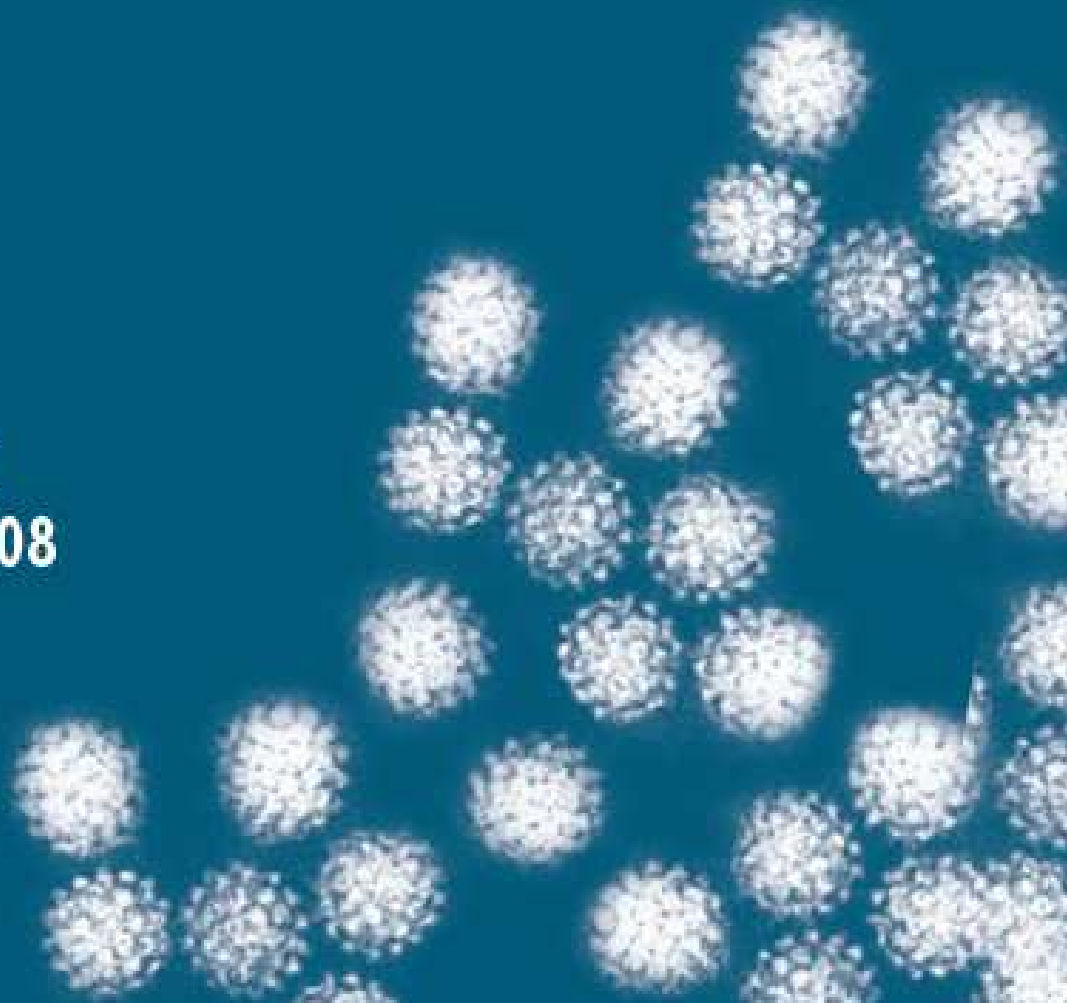


**ANÀLISI DE POLIOMAVIRUS
I ADENOVIRUS HUMANS
COM A INDICADORS
DE LA CONTAMINACIÓ VÍRICA
D'ORIGEN HUMÀ EN AIGUA**

Néstor Albiñana Giménez

**Tesi Doctoral
Setembre 2008**



**ANÀLISI DE POLIOMAVIRUS I ADENOVIRUS HUMANS COM A
INDICADORS DE LA CONTAMINACIÓ VÍRICA D'ORIGEN HUMÀ EN
AIGUA**



Departament de Microbiologia
Facultat de Biologia Universitat de Barcelona

Memòria presentada per

Néstor Albiñana Giménez

per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Programa de Doctorat: Microbiologia Ambiental y Biotecnologia

Bienni: 2002-2004

Tesi realitzada sota la direcció de la Dra. Rosina Gironés, al departament de
Microbiologia de la Universitat de Barcelona.

VP de la directora,

El doctorand,

Dra. Rosina Gironés Llop

Néstor Albiñana Giménez

Barcelona, Setembre 2008

RESUM GLOBAL

Aquesta tesi s'ha emmarcat en l'estudi de la presència, distribució i mecanismes de transmissió dels poliomavirus humans JC i BK i dels adenovirus humans així com estudiar la seva utilitat com a indicadors tant de contaminació fecal vírica d'origen humà com dels processos de potabilització de l'aigua de consum. Per això, en la primera part d'aquest estudi es va treballar per completar un estudi iniciat en fases anteriors del nostre grup sobre la presència del poliomavirus humans a l'aigua residual i a l'ambient. Es va estudiar la potencial excreció del poliomavirus SV40 en infeccions naturals del hoste animal en una colònia de micos naturalment infectats i en la població humana que viu pròxima als hostes naturals analitzant aigua residual del nord de la Índia. En la segona part de la tesi, un cop definit que SV40 no es consideraria un virus comunament excretat per la població humana, s'ha continuat l'estudi de l'aplicació dels adenovirus humans i els poliomavirus humans (JCPyV especialment) com a indicadors vírics de la contaminació fecal d'origen humà en aigües superficials i de beguda. Per això es va realitzar un estudi quantitatiu de la presència d'aquests virus en l'ambient i en diversos punts d'una planta potabilitzadora. Per tal de millorar la metodologia per concentrar i quantificar els virus es va fer una comparació i optimització de mètodes i els mètodes seleccionats per ser els més aplicables y eficients es van usar en un mostreig anual en tres plantes de tractament d'aigua de beguda. Finalment aquesta tesi es va proposar aprofundir en l'estudi de la infecció d'aquests virus en cultiu cel·lular, per poder proporcionar sistemes de cultiu per permetre estudis d'infectivitat i també per conèixer millor la seva cinètica d'infecció i els seus mecanismes de transmissió.

La potencial transmissió de SV40 entre la població humana arrel de la contaminació de les vacunes de la polio ha esdevingut un tema de controvèrsia científica sobretot considerant la possible implicació d'aquest virus en la producció de càncer. Per això ens vam proposar estudiar el patró de transmissió de SV40 en el seu hoste natural i posteriorment estudiar la possible excreció d'aquest virus entre la població humana en una àrea on cohabita amb l'hoste natural analitzant l'aigua residual.

Per estudiar el patró d'excreció de SV40 en els hostes naturals es van analitzar mostres ambientals de 4 gàbies de micos naturalment infectats per SV40. Es va detectar SV40 per PCR dues de les caixes a nivells de 10^1 - 10^4 còpies genòmiques per 4ml de mostra. Els experiments de serologia en la colònia de micos van mostrar que tots els micos estudiats en aquest treball van ser seropositius amb un alt títol d'anticossos. Això suggereix que la transmissió d'aquests virus i la seroconversió es

produeix durant la seva estança als grups juvenils, tal com va suggerir Minor i col. (2003) quan va estudiar la cinètica de seroconversió en la colònia.

S'ha suggerit que la transmissió del virus es produeix per la ruta fecal-oral pels micos en condicions naturals. Sembla ser que els micos s'infecten quan estan en grups grans, probablement per l'increment de probabilitats de contacte entre virus excretats i el nou hoste sense la protecció dels anticossos materns.

La soca aïllada va resultar idèntica a la soca W17, aïllada a partir d'una biòpsia de ronyó de mico efectuada al *National Institute for Biological Standards and Control*, UK (NIBSC) alguns anys abans (Minor i col. 2001; 2003). Aquesta soca té la regió reguladora amb configuració arquetípica idèntica a algunes soques aïllades de teixits de mico; la regió hipervariable (C-terminal del TAg) va presentar identitat amb soques trobades a tumors humans i ha demostrat que es una soca que infecta la colònia estudiada amb una seqüència de nucleòtids molt estable .

La regió reguladora de la soca aïllada conté només una còpia de l'*enhancer*. Tot i això, no hi ha informació sobre la possible varietat de soques que podrien estar presents a la colònia (Minor i col. 2003). Segons la informació disponible sobre SV40 en micos es podria esperar gran varietat de soques en relació a la regió reguladora en un mateix animal, inclús en el teixit renal d'un individu. De tota manera les soques majoritàries excretades en orina, com en el cas de JCPyV i BKPyV en humans, són les d'estructura arquetípica com les que hem trobat en aquest estudi.

La soca que s'ha aïllat en aquest estudi va presentar estabilitat en la regió reguladora, ja que va resultar idèntica abans i després d'experiments d'infecció en cèl·lules CV-1, on va coinfectar amb adenovirus, uns virus molt comuns a l'ambient (Bofill-Mas i col. 2000).

Per avaluar el paper de la contaminació ambiental en la transmissió de SV40 es van realitzar també un anàlisis de l'estabilitat de SV40 en aigua residual. La t_{90} estimada de SV40 en aigua residual a 20°C va ser de 39.9 dies, i la t_{99} de 64.7 dies. En el control de PBS es va detectar SV40 fins al dia 210.

Els resultats confirmen l'aplicabilitat dels mètodes utilitzats per la detecció i aïllament de SV40 en mostres ambientals, per tant el fet que no poguéssim detectar SV40 en mostres d'aigua residual de àrees urbanes en aquest i en anteriors estudis va

ser probablement perquè realment no hi era present en nivells detectables (Bofill-Mas i col. 2000).

En la següent fase de l'estudi es van analitzar 30 mostres d'aigua superficial i residual de diferents àrees del nord de la Índia on hi ha hagut a través dels anys més possibilitat de contacte entre els hostes animals del virus i la població humana i es va estudiar la presència d'adenovirus humans, poliomavirus humans i SV40. El 40% de les mostres van ser positives per HAdV. D'acord amb estudis previs, aquests virus són freqüentment excretats per la població humana i es poden trobar en aigua amb contaminació fecal humana (Girones i col. 1995; Pina i col. 1998; Puig i col. 1994). Les mostres provinents de zones rurals es van prendre de rius i estanys freqüentats per colònies de macacs salvatges. Aquesta pot ser la raó de la baixa detecció d'adenovirus humans en aquestes mostres. En canvi, la majoria de mostres provinents de zones urbanes (origen humà) són positives.

El poliomavirus JC va ser trobat en sis mostres (20%) i BK en tres d'aquestes mostres (10%). La baixa detecció dels poliomavirus humans en el present treball pot ser degut al factor dilució de la contaminació en les mostres estudiades produït per la pluja i l'aigua superficial no contaminada.

Totes les mostres positives per JCPyV excepte una van ser també positives per HAdV, i totes les mostres positives per BKPyV ho van ser també per JCPyV. Això confirma l'origen humà de la contaminació i recolza la hipòtesi de la dilució que explica les mostres negatives.

SV40 només es va trobar en una mostra amb possible contaminació d'origen humà i macac de Bengala Occidental, indicant que el virus podria estar circulant en el medi ambient però no hi ha cap evidència de que sigui excretat per la població humana. Els virus presents en la mostra probablement provenien d'una colònia de micos.

SV40 no es va detectar en mostres amb contaminació exclusivament humana en diverses àrees geogràfiques estudiades, el que suggereix que els humans no presenten un patró d'excreció per SV40 similar al dels poliomavirus humans i SV40 no es pot considerar un potencial contaminant de l'ambient. No obstant, es necessitarien analitzar nombres més grans de mostres de la regió de la Índia estudiada per tenir una confirmació definitiva de l'absència d'excreció de SV40 en humans d'aquesta àrea.

La segona part d'aquesta tesi s'ha basat en estudiar la presència d'adenovirus humans, patògens emergents com els poliomavirus humans JC i BK i el virus de l'hepatitis E en aigua superficial i avaluar la seva eliminació en plantes de tractament d'aigües de beguda. La demanda d'aigua de qualitat a nivell mundial està incrementant la pressió en les polítiques mediambientals i de salut pública. Es disposa de molta informació sobre alguns microorganismes patògens transmesos per l'aigua, però degut sobretot als avenços científics i tecnològics dels darrers temps, ha guanyat importància la presència de nous virus amb potencial patogènic i virus amb potencial interès per ser utilitzats com a marcadors de contaminació fecal més estables que els paràmetres bacterians utilitzats actualment pel control de la qualitat microbiològica de l'aigua. Degut a això, ens vam plantejar l'aplicació de dos d'aquests grups de virus com a indicadors de processos de potabilització i com a índex de la qualitat virològica de l'aigua de beguda.

Grans quantitats de virus són excretades a l'ambient i en rius usats com a font d'entrada a plantes potabilitzadores. En estudis previs s'han detectat alts nivells de contaminació vírica en aigua residual i plantes de tractament d'aigua residual (Bofill-Mas i col. 2000, Bofill-Mas i col. 2006, He i Jiang 2005, Pina i col. 1998). Els efluents de les plantes de tractament d'aigua residual són sovint conduïts a rius que després són usats com a font d'aigua per les plantes potabilitzadores. Aquesta càrrega vírica podria representar un risc d'infeccions per la població si no s'apliquen i es controlen adequadament els tractaments de potabilització.

En una primera fase de l'estudi es van analitzar mostres d'aigua del riu Ter, aigua del riu Llobregat i aigua filtrada per carbó activat (en el punt previ a la cloració final dins la planta de tractament); també en aquesta planta es van analitzar mostres de fangs de sedimentació. Es van analitzar també mostres d'aigua residual urbana i mostres de biosòlids procedents de plantes depuradores d'aigua residual d'escorxadors.

Es va analitzar i quantificar la presència d'adenovirus humans, JCPyV, BKPyV i HEV en mostres ambientals i es va fer una avaluació preliminar de l'eficiència d'eliminació d'aquests virus en una planta de tractament d'aigua de beguda. Els mètodes usualment aplicats en diferents estudis previs per a la concentració de virus van presentar una eficiència baixa i molt variable, indicant-nos que la concentració dels virus estudiats a les mostres podria ésser molt més alta. Es va trobar una diferència d'un logaritme entre les concentracions d'HAAdV i JCPyV tant a les mostres d'aigua com

a les mostres d'aigua residual. Aquesta diferència ja s'havia observat en estudis anteriors usant PCR niada (Bofill-Mas i col. 2000).

Assumint la baixa eficiència del mètode de recuperació, encara es van trobar virus a l'aigua preclorada, que per altra banda va presenta absència d'indicadors microbians. Això podria representar un risc per la salut pública si la desinfecció secundària no funciona correctament.

Els adenovirus humans s'acumulen als llots de sedimentació. Amb l'aplicació d'aquests llots en l'agricultura, els virus podrien ser disseminats i representar una font difusa de contaminació vírica a l'ambient. HEV va ser detectat en aigua residual, confirmant els resultats d'estudis previs que indiquen que aquest virus és freqüentment excretat en baixes concentracions al medi ambient per la població d'àrees industrialitzades (Clemente-Casares col. 2007).

Per aprofundir aquest estudi es va decidir fer un replantejament de la metodologia de concentració de virus, per això es van comparar quatre mètodes per concentrar virus a partir de mostres d'aigua. Per avaluar la seva eficiència de recuperació es van dopar mostres de 10 i 50 litres d'aigua amb concentracions conegudes d'adenovirus humans, *Poliomavirus JC* i *Norovirus* i es van processar amb els diferents mètodes. La quantificació de la recuperació es va fer amb PCR quantitativa.

Per mostres de 10 litres el mètode que va presentar millors recuperacions va ser el mètode 3 basat en ultrafiltració però pot ser aplicat només en mostres amb molt baixa terbolesa perquè els filtres es colmaten fàcilment i no va permetre la recuperació de *Norovirus*. El mètode 1, basat en l'adsorció dels virus en una matriu de llana de vidre amb una pre-acidificació prèvia de la mostra va presentar bones recuperacions i per tant va ser seleccionat per l'anàlisi de virus en mostres de fins a 10 litres.

En mostres de 50 litres, el mètode usat en la fase anterior de l'estudi va presentar recuperacions molt baixes. Aquest volum de mostra va ser escollit per representar mostres de grans volums (>100 litres), que són els que es necessita analitzar de mostres on s'espera molt baixa concentració de virus, com l'aigua de beguda. El mètode 1 no va ser avaluat en aquestes mostres, degut a la impossibilitat d'ajustar el pH en mostres de grans volums. El mètode 2, essent idèntic al 1 però sense la pre-acidificació de la mostra, va presentar millors recuperacions.

En altres estudis obtenen majors recuperacions usant mètodes similars, per exemple, Vilaginès i col. (1993) va trobar eficiències de recuperació del 62-75% per enterovirus en aigua de beguda. La quantificació dels virus es va efectuar per comptatge de partícules infectives en cultiu cel·lular. Usar mètodes de comptatge per PFUs pot sobreestimar l'eficiència de recuperació dels mètodes de concentració degut a la disgregació de cúmuls de partícules víriques després de la dilució de l'inòcul en la mostra, que representaria un increment del nombre de PFUs quantificats en la concentració. Quan s'usa qPCR per la quantificació de virus, es conten les còpies d'àcid nucleic, tant de les partícules víriques infectives com de les defectuoses, inclús petites quantitats de DNA lliure que podrien estar presents en les suspensions virals usades per dopar.

S'ha de tenir en compte que la majoria de les soques de JCPyV presents a l'ambient presenten regió reguladora arquetípica i creixen molt ineficientment en cultiu cel·lular (Bofill-Mas i col. 2000). Per tant, la qPCR no és només el mètode més sensible per la quantificació de virus sinó que de vegades també és l'únic del que disposem per alguns virus com JCPyV i NoV.

Es va observar freqüentment inhibició de reaccions d'amplificació degut a substàncies presents a les mostres, com àcids húmics i metalls (Abbaszadegan i col. 1999, Donaldson i col. 2002). A més, els mètodes 1, 2 i 4 requereixen per eluir els virus dels filtres l'ús d'extracte de carn, el qual potencialment pot inhibir la amplificació per PCR (Abbaszadegan i col. 1993). Per millorar la recuperació de virus tot disminuint al màxim el límit de detecció es van comparar dos kits d'extracció d'àcids nucleics. Encara que el kit A va presentar una eficiència unes 2,6 vegades millor que el kit B, aquest últim permet disminuir el límit de detecció concentrant més volum de mostra. Tot i això els kits no van poder eliminar del tot els inhibidors i es van haver d'analitzar dilucions 10^{-1} i 10^{-2} de les extraccions.

Per determinar quin hauria de ser el volum idoni de mostra d'aigua del riu Llobregat, usat com a font d'aigua de la planta potabilitzadora de Sant Joan Despí, es va comparar l'anàlisi de quatre volums de mostra sense dopar. Volums d'1 l, 10 l i 50 l van ser processats amb el mètode 1 (llana de vidre i pre-acidificació) i 42 ml van ser processats amb el mètode 5 (ultracentrifugació). El volum que millors resultats va presentar va ser d'1 litre, donat que va ser el volum que va permetre la major quantificació de virus i el mateix límit de detecció que les mostres de 10 l.

Els mètodes seleccionats van presentar bones eficiències de recuperació i són reproduïbles a un cost molt baix. Els mètodes desenvolupats per la concentració d'indicadors vírics humans (adenovirus humans i *Poliomavirus JC*) i patògens emergents (*Norovirus*) usant llana de vidre i qPCR són fàcils d'estandaritzar i poden ser eines valuoses pel control de la contaminació vírica en aigua crua i l'eficiència d'eliminació de virus en plantes de tractament d'aigua de beguda.

Un cop escollits els mètodes més adients, es va procedir al mostreig. Es va quantificar JCPyV i HAdV per qPCR en mostres de diversos punts en tres plantes de tractament d'aigua de beguda de Catalunya.

Totes les mostres d'aigua de riu (entrada) de la planta 1 van ser positives per HAdV, amb una concentració mitjana de $1,24 \times 10^4$ GC/L; 44% de les mostres van ser positives per JCPyV amb una concentració mitjana de $7,4 \times 10^2$ GC/L. Els resultats obtinguts en aigua de riu a la planta 3 són similars, amb un 83% de mostres positives per HAdV ($9,24 \times 10^3$ GC/L) i un 50% positives per JCPyV ($1,3 \times 10^3$ GC/L). Les mostres d'aigua crua de la planta 2 van presentar nivells mes baixos de contaminació, ja que provenien d'aqüífers subterranis. Nivells similars de virus van ser trobats al llarg de tot el tractament d'aquesta planta.

La reducció de les concentracions de JCPyV i HAdV quantificats com a còpies genòmiques durant el tractament en les plantes va ser calculat per la diferència entre la concentració en aigua crua i la concentració a l'aigua de beguda. Per HAdV, la planta 1 va presentar una reducció de més de 5,13 logaritmes entre l'aigua d'entrada i la de sortida i 5,13 logaritmes entre la d'entrada i l'aigua filtrada per GAC. Només una mostra d'aigua filtrada per GAC va ser positiva per HAdV. Per JCPyV la reducció va ser de >5 logaritmes a l'aigua de sortida i de 3,51 logaritmes entre l'aigua d'entrada i la filtrada per GAC. La mostra filtrada per GAC positiva per HAdV va ser testada en cultiu cel·lular però no va produir infecció en cèl·lules A549.

El tractament d'ozonització aplicat sembla que té poc efecte en la quantificació de genomes vírics, tot i que es va observar un 98,8% d'eliminació de bacteries heteròtrofes. L'ozó és un agent molt oxidant i una alternativa efectiva al clor per la reducció de patògens a l'aigua, però té alguns desavantatges com la seva curta vida mitja, la necessitat de ser generat *in situ*, la seva corrosivitat i la seva toxicitat (AWWA 1995). El tractament dissenyat a la planta 1, si és correctament aplicat garanteix 0,1-0,2

mg/L d'ozó residual a les cambres d'ozonització on l'aigua i roman durant 15-20 minuts, encara que el sistema pot patir parades ocasionals. Les concentracions d'ozó requerides per inactivar diferents microorganismes són altament dependents del propi microorganisme; poden haver-hi diferències de resistència fins i tot dins la mateixa família. No es descarta la possibilitat de que la major part dels virus fossin inactivats durant la ozonització però les partícules i el DNA quedés relativament intacte. La tendència d'aquests virus a agregar-se no hauria de ser oblidada, els agregats podrien protegir algunes partícules víriques dels tractaments desinfectants. No es va identificar partícules víriques de HAdV infectives en cultiu cel·lular el que suggereix que els genomes quantificats podrien correspondre a virus no infectius.

En aquest cas la reducció més important de virus es va observar després de la filtració per sorra després de la cloració efectuada a la entrada de la planta.

La planta 2 va presentar nivells més baixos de contaminació. L'aigua subterrània que usa té menys probabilitats de ser contaminada, encara que les filtracions o el contacte amb aqüífers contaminats podrien ser la causa de trobar baixos nivells de contaminació fecal a les mostres. L'eliminació global calculada per HAdV va ser de més de 2 logaritmes, però hi va haver una mostra positiva d'aigua de sortida o sigui que en el pitjor dels casos la reducció va ser de 0,67 logaritmes. Per JCPyV la reducció va ser de més de 2 logaritmes. Els resultats de la quantificació de virus en aquesta planta eren inesperats, ja que la planta usa sistemes de nanofiltració i osmosi reversa. D'acord amb la literatura, cap partícula vírica, ni tan sols DNA podria travessar aquest tipus de membranes però en canvi es troben baixos nivells de virus en totes les fases dels tractaments. Una possible explicació de la detecció esporàdica de virus després d'aquests tractaments és que les membranes o la instal·lació a la planta pot tenir petites imperfeccions o fissures que podrien deixar passar una petita quantitat de virus. Les concentracions trobades a la planta 2 són al límit de detecció; la eliminació global estimada es baixa, ja que es van trobar mostres positives a llarg de tot el tractament.

Les concentracions de virus trobats a la planta 3 van ser similars als de la planta 1. Els alts nivells de contaminació bacteriana i vírica a l'entrada poden ser explicats pel fet que la planta està situada uns centenars de metres riu avall de l'efluent d'una planta de tractament d'aigua residual i a la mateixa llera. L'eliminació d'HAdV va ser major de 5 logaritmes, però dues mostres d'aigua tractada van ser positives per tant, en el pitjor dels casos la reducció va ser de 4,94 logaritmes. Cap mostra tractada va ser positiva per

JCPyV, la seva eliminació va ser major a 5 logaritmes. Els tractaments més efectius en aquesta planta podrien estar relacionats amb les dues cloracions, una a l'entrada de la planta i l'altra després dels filtres de GAC.

Tres mostres d'aigua tractada de les plantes 2 i 3 van ser positives per HAdV. La caracterització d'aquests virus va donar un 98% d'homologia amb HAdV2 però no van produir infecció en els cultius cel·lulars assajats, suggerint que els virus poden haver estat inactivats en fases prèvies del tractament. Un tractament desinfectant pot afectar l'eficiència de tractaments més endavant en el procés. La presència de sòlids suspesos incrementa la resistència dels microorganismes a la desinfecció, per tant una baixa eficiència en eliminar la torbesa de l'aigua pot disminuir l'eficiència de posteriors tractaments de desinfecció.

Tres plantes de tractament d'aigua de beguda de la zona de París van ésser també mostrejades i analitzades amb èxit, demostrant que el mètode pot ser fàcilment aplicat en altres laboratoris.

Es van trobar consistentment virus a mostres de totes les plantes amb absència o molt baixa concentració d'indicadors, recolzant estudis previs sobre la manca de correlació entre indicadors vírics i bacterians (Formiga-Cruz i col. 2003, Gerba i col. 1979, Lipp i col. 2001, Tree i col. 2003). La concentració d'HAdV detectada al riu és equivalent a la concentració observada de *E.coli* i enterococs en moltes mostres, recolzant l'ús dels adenovirus humans com a indicadors d'eliminació de contaminació en plantes de tractament d'aigua de beguda.

La qPCR és una tècnica molt sensible i produeix ràpidament dades quantitatives sobre la presència de genomes vírics. Els resultats negatius són un fort indicador de l'eliminació eficient de virus en plantes de tractament d'aigua de beguda, però resultats positius en aigua de beguda requereixen l'avaluació de la seva capacitat infectiva abans de poder calcular acuradament el risc associat. S'han aplicat amb èxit mètodes simples de concentració basats en l'adsorció/elució de virus en llana de vidre en tres plantes de tractament d'aigua de beguda de Catalunya. La quantificació de JCPyV i HAdV amb qPCR ha provat ésser útil per avaluar l'eficiència d'eliminació de virus en plantes de tractament i per la identificació de punts crítics de control i com a índex de la qualitat virològica de l'aigua d'entrada.

La darrera part d'aquesta tesi s'ha centrat més en estudiar el comportament dels virus estudiats quan infecten diversos tipus de cultiu cel·lular per poder conèixer millor la seva cinètica d'infecció i el seu mecanisme de transmissió.

En l'organisme humà, el poliomavirus JC es replica només en un nombre limitat de tipus cel·lulars, incloent oligodendròcits. El mateix tropisme cel·lular s'observa in vitro i s'ha atribuït a factors de transcripció específics requerits per la trans-activació dels promotor primerenc de JCPyV. Tot i això s'han descrit infeccions persistents als ronyons i conseqüentment els virus són excretats en la orina (Eash i col. 2006). Els diversos serotips d'HAdV creixen amb eficiència variable en diverses línies cel·lulars com BGMK, CaCo-2, HeLa, Hep-2, A549 i 293 Human Embryonic Kidney (HEK) (Jiang, 2006).

Per estudiar la infecció i la replicació de DNA d'HAdV en condicions òptimes vam realitzar una corba de creixement d'HAdV2 en cèl·lules A549 que són permissives per la infecció d'aquest virus; la infecció va ser molt eficient. El virus s'ha vist que infecta menys eficientment les cèl·lules CaCo-2. En estudis previs s'ha comprovat que una de les soques que es poden cultivar amb més facilitat de JCPyV, la soca Mad-4 no fa infecció productiva en aquestes mateixes cèl·lules CaCo-2 (Bofill-Mas i col. 2003).

Hi ha estudis que descriuen l'activació de JCPyV en cultius no permissius mitjançant un virus "helper" o facilitador (Heilbronn i col. 1993; Winklhofer i col. 2000). S'han descrit també interaccions entre poliomavirus humans i adenovirus (Miyamura i Takemoto, 1979). Una hipòtesi és que els HAdVs actuen com a "helpers" en la infecció de JCPyV a l'epiteli intestinal, proporcionant pistes sobre el lloc de la infecció primària d'aquests virus en l'organisme humà.

En la coinfecció d'HAdV2 i JCPyV Mad-4 en CaCo-2, HAdV2 presenta una cinètica similar a quan infecta sol però Mad-4 no presenta cap increment de còpies genòmiques sinó una tendència a reduir el seu nombre. Les còpies genòmiques de JCPyV detectades a les 250 hores post-infecció probablement corresponen a les que s'hi van introduir al principi de l'experiment. La tècnica usada per la detecció no ens permet saber si les partícules víriques van ser internalitzades o es van quedar adsorbides a la superfície cel·lular. Aquests resultats suggereixen que HAdV2 no actua com a activador de la replicació de JCPyV en les condicions experimentals estudiades.

La cinètica de replicació de la soca reorganitzada Mad-4 de JCPyV va ser definida en cèl·lules glials fetals humanes (SVG). Mad-4 infecta eficientment aquesta línia cel·lular. La cinètica de JCPyV arquetípic no va mostrar cap increment durant tot el període de l'experiment. Les variants arquetípiques de JCPyV són molt difícils de cultivar en línies cel·lulars. Hara i col. (1998) va descriure el cultiu d'una soca arquetípica de JCPyV en cèl·lules Cos-7, que contenen el TAg de SV40. En el present estudi JCPyV arquetípic no va presentar replicació qualificable en cèl·lules SVG en les condicions estudiades suggerint que no hi ha infecció productiva o que aquesta requeriria més temps tal com es descriu en Bofill-Mas i col (2003) que observen la infecció productiva de JCPyV arquetípic després de 40 dies d'infecció en cèl·lules SVG.

Les variants reorganitzades de JCPyV poden ser cultivades en cèl·lules glials i algunes línies de cèl·lules B (Atwood i col. 1992). S'ha suggerit que la restringida capacitat lítica de JCPyV arquetípic, comparada amb soques reorganitzades, es deu a reorganitzacions específiques de les regions promotores. Aparentment les soques arquetípiques són incapaces de produir els nivells necessaris del mRNA del TAg per activar la replicació (Daniel i col. 1996).

La corba de creixement de BKPyV arquetípic en cèl·lules SVG va mostrar una replicació molt ineficient i no es va observar CPE. A la bibliografia es poden trobar descripcions de la interacció de BKPyV amb altres poliomavirus (Caputo i col. 1986, Ryder i col. 1983). Per estudiar la mecànica de transmissió de BKPyV vam estudiar la interacció entre aquest i JCPyV en una línia cel·lular permissiva per aquest últim. Els resultats van mostrar que, encara que BKPyV presenta una replicació molt ineficient, la replicació del DNA de JCPyV sembla més eficient comparada amb la infecció de JCPyV sol en aquesta mateixa línia cel·lular (figura 2) arribant a la fase estacionaria 50 hores abans. Els anàlisis estadístics de la regressió comparant les dues corbes de creixement van demostrar que hi ha diferències estadísticament significatives en la pendent de les rectes de regressió. Això suggereix que la coinfecció amb BKPyV podria incrementar l'eficiència de replicació de JCPyV en fases primerenques de la infecció. Els resultats obtinguts indiquen que BKPyV podria facilitar la infecció de JCPyV reduint la fase primerenca, ajudant així potencialment a l'establiment de la infecció en l'organisme humà, encara que es necessiten més estudis per confirmar aquesta hipòtesi. Mentre que la població es veu infectada per BKPyV en la primera infància, la infecció per JCPyV requereix més temps per estendre's entre la població i ho fa més tard que BKPyV (Taguchi i col. 1982; Walker i Padgett, 1983). La presència de BKPyV podria doncs

facilitar la subsegüent infecció per JCPyV i l'establiment d'una infecció persistent per part de les soques arquetípiques menys infectives presents a l'orina.

Per definir la cinètica de replicació d'una soca reorganitzada de BKPyV, es va realitzar una corba de creixement de la soca Dunlop en cèl·lules HNK-1. La replicació va ser molt eficient, en canvi SV40 va presentar una replicació molt ineficient en aquesta. Aquest virus presenta un 70% d'homologia amb el genoma de BKPyV (Hirsh i Steiner, 2003). Com s'ha comentat anteriorment, hi ha estudis que descriuen la interacció entre BKPyV i SV40 (Caputo i col. 1986, Ryder i col. 1983). Per explorar la possible interacció entre aquests dos virus en cèl·lules de ronyó es va realitzar una corba de creixement coinfectant BKPyV Dunlop i SV40 777. SV40 va presentar una replicació molt similar a quan infecta en solitari. Encara que es pot observar un petit increment en la eficiència de replicació de BKPyV quan coinfecta amb SV40 respecte a quan infecta en solitari, els anàlisis estadístics conclouen que no hi ha diferències significatives.

En aquest estudi s'ha usat PCR quantitativa per definir les cinètiques d'infecció dels virus descrits quantificant les còpies genòmiques generades. Les cinètiques d'infecció descrites aquí poden representar informació molt útil per estudis dels aspectes clínics i biològics de la infecció de JCPyV. Tot i les limitacions de les condicions experimentals per la multiplicació de JCPyV, els suggereixen que una infecció inicial per BKPyV (que infecta la població en els primers anys de vida) podria afavorir l'establiment d'una infecció permanent per JCPyV, contribuint a explicar el fet que JCPyV infecta la població més tard que BKPyV encara que s'excreta amb més freqüència per la orina.