

**ANA MARIA SAMPAIO**

**PADRONIZAÇÃO E IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE  
ANTIGENEMIA PARA MONITORIZAÇÃO DA INFECÇÃO  
PELO HHV-6 E HHV-7 E AVALIAÇÃO DA CO-INFECÇÃO  
COM HCMV NO PÓS TRANSPLANTE HEPÁTICO**

**CAMPINAS**

**2012**





UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Médicas

**PADRONIZAÇÃO E IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE  
ANTIGENEMIA PARA MONITORIZAÇÃO DA INFECÇÃO  
PELO HHV-6 E HHV-7 E AVALIAÇÃO DA CO-INFECÇÃO  
COM HCMV NO PÓS TRANSPLANTE HEPÁTICO**

**ANA MARIA SAMPAIO**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual  
de Campinas, para obtenção do título de Doutor em  
Ciências, sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ilka de Fátima Santana

Ferreira Boin      **Errata:** “ e Co-orientação da Prof.Dra. Raquel Silveira Bello Stucchi”

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ilka de Fátima S. Ferreira Boin  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia  
FCM/UNICAMP  
Matrícula 059170

**CAMPINAS**

**2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

Sa47p Sampaio, Ana Maria, 1970 -  
Padronização e Implantação da Técnica de  
Antigenemia para Monitorização da Infecção pelo HHV-6  
e HHV-7 e a avaliação da Co-infecção com HCMV no  
Pós Transplante Hepático. / Ana Maria Sampaio. --  
Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Ilka de Fátima Ferreira Santana Boin.  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Fígado - transplante. 2. Citomegalovírus. 3.  
Viroses. I. Boin, Ilka de Fátima Ferreira Santana. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Standardization and implantation of antigenemia technique for HHV-6 and HHV-7 infection monitoring and evaluation of co-infection with HCMV after liver transplantation.

**Palavras-chave em inglês:**

Liver transplantation

Cytomegalovirus

Virus disease

**Área de concentração:** Fisiopatologia Cirúrgica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:**

Ilka de Fátima Ferreira Santana Boin [Orientador]

Andrea Mendonça Gusmão Cunha

Regina Barbosa Schroeder

Orlando Petrucci Júnior

Maria Ângela Bellomo Brandão

**Data da defesa:** 23-02-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências

**Banca Examinadora da Defesa de Doutorado**  
**Ana Maria Sampaio**

Orientador: Prof. Dr. Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin

**Membros:**

1. Prof(a). Dr(a). Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin -



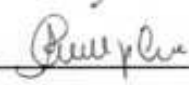
2. Prof(a). Dr(a). Orlando Petrucci Junior-



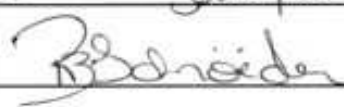
3. Prof(a). Dr(a). Maria Ângela Bellomo Brandão-



4. Prof(a). Dr(a). Andrea Mendonça Gusmão Cunha-



5. Prof(a). Dr(a). Regina Barbosa Schroeder-



Curso de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 23/02/2012



ESPECIALMENTE, ao precursor da minha jornada de vida e também acadêmica, meu querido esposo Mauro Dantas Neder (*in memorian*), ele foi um grande exemplo como ser humano, tanto no aspecto pessoal quanto profissional. Dotado de uma rara INTELIGÊNCIA e HUMILDADE. Estará sempre muito presente na minha memória e em meu coração. Serei eternamente sua admiradora, e grata por tudo que fez por mim, pela chance que até hoje reflete nos meus dias. Obrigada pelo marido e pelo grande pai que foi!

Ao meu filho Gabriel Sampaio Neder, por sua presença em todos os momentos da travessia, pelas palavras de carinho, abraços e compreensão. Pelo simples olhar o qual me inspira sempre a caminhar.

À minha filha Luana Gabriele Sampaio, por sua existência em minha vida, pelo amor que sinto e por tudo que acredito.

À minha mãe Ana Rosa, aquela que me trouxe ao mundo, a responsável por minha existência e formação.

Aos meus irmãos Paulo, Roberto, Maria e Elizabete, pela existência em minha vida.

Aos meus filhos do coração Yumi e Fabio Neder pela união, respeito carinho e amizade.

Aos meus sobrinhos, por todo carinho, Fabiano, Andreia, Suzana, Viviane, Natalia, Mariana, Natan, Vinicius, Yuri, Éric e o Cauã que está por vir.

À minha querida e inesquecível amiga Michele Servais (*in memorian*), que foi colega de faculdade e que no mesmo período chegamos aqui na Universidade com tantas expectativas e sonhos da nossa tão esperada pós-graduação, tantas conversas e muitas vezes partilhas de conhecimentos e





experiências. Hoje não mais juntas fisicamente, mas com a certeza de que os laços sempre permanecerão porque ninguém entra na vida do outro por um acaso.

Ao colega Allan Nobuko Sazaki (*in memorian*), residente da Instituição e que, como graduando em sua função da iniciação científica, teve importante participação direta neste estudo, no levantamento de prontuários e na parceria da captação das amostras. Tão jovem partiu deste mundo, mas que deixou registrado uma importante colaboração neste trabalho por sua competência, dedicação e sintonia.

Aos pacientes a minha eterna ADMIRAÇÃO e RESPEITO, por todos que fizeram parte deste estudo e que tanto contribuíram com suas experiências de vida, trazendo sempre uma lição de fé, amor e esperança. São os olhos que jamais serão esquecidos ou apagados de minha memória. Também a vocês eu dedico o mérito deste trabalho.

Ainda para todas aquelas almas que fizeram o BEM e deram um pedaço de si para salvar a vida de um irmão.

Também a minha eterna admiração aos familiares dos doadores de órgãos, que permitiram doar uma parte de seus entes queridos. “Essa nobre atitude é dar a oportunidade para que outra pessoa possa realizar seus sonhos”.



## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

---

Primeiramente a DEUS que é o autor do meu raciocínio, do meu coração, da minha vida e de tudo que nela acontece. É de sua autoria esse presente maravilhoso e de valor inestimável. Obrigado por me amparar em vários momentos. Agradeço-te de todo o meu coração, por me mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir de todas as necessidades. Obrigada meu DEUS pela perseverança e amadurecimento que essa pesquisa me proporcionou. Sei que teus olhos sempre atentos permaneceram em mim. És meu SENHOR de perto, meu DEUS de promessas e de aliança, TÚ és FIEL. Faça-se sempre em mim a tua vontade... Este é mais um projeto SEU uma obra que se CUMPRE.

A Prof<sup>a</sup> Ilka de Fátima Ferreira Santana Boin, que nestes últimos 10 anos da minha vida acadêmica tem sido uma grande incentivadora e inspiradora, foi a mão que me estendeu quando mais precisei. Na sua qualidade de orientadora foi também tantas vezes amiga-mãe-irmã. Admiro por sua competência profissional e tamanha HUMILDADE. Agradeço por sua generosidade nas últimas semanas ter me recebido em sua casa fora de horários, sempre disposta a ajudar, e se doando o tempo todo na finalização deste trabalho. A orientação que ultrapassou a tese nos momentos de maior dificuldade e de insegurança. Obrigada por ter assumido a orientação e, sobretudo, o privilégio de haver trabalhado em um tema para o qual você tanto vem contribuindo e incentivando as produções científicas. Agradeço por sua permanente solicitude em todas as fases do projeto, bem como pelas ricas sugestões assim como sua compreensão, que muito me ajudaram a superar as situações-limite de prazo, estimulando-me a seguir em frente. Espero que a conclusão deste trabalho seja apenas mais um de outros que já fizemos e de tantos que ainda terão por vir. Foi uma honra ter trabalhado ao seu lado, que DEUS sempre a proteja e ilumine sua trajetória de vida.



## AGRADECIMENTOS GERAIS

---

Esta não foi uma breve caminhada ou história, mas a travessia que nos últimos dias pareciam sem fim, principalmente pelas intercorrências pessoais. Esses percalços, longe de obscurecerem o trajeto, aumentaram ainda mais o brilho e me impulsionaram-me com mais força. Mas essa força tem um nome, um DEUS que CREIO e na solidariedade humana. Eis que chegou o momento de expressar os mais sinceros agradecimentos a muitos que tanto colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e quanto aos que se revelaram ao longo desse tempo. Sei que até corro o risco de não dar conta desse MUITÍSSIMO obrigado, como é merecido. Talvez num processo final de uma “tese” seja o resultado mais visível da construção em meio a uma conjugação de afetos e amizades. Dessa forma, dando continuidade a mais um ciclo se cumprindo, inicio a minha profunda gratidão:

Aos Professores: Dr Orlando Petrucci Junior, Dr<sup>a</sup> Maria Angela Bellomo Brandão, Dr<sup>a</sup> Regina Barbosa Schroeder e Dr<sup>a</sup> Andrea Mendonça Gusmão Cunha por aceitarem compor a banca de defesa da tese.

À Prof<sup>a</sup> Dra Sandra Costa em especial, pela oportunidade do inicio, respeito confiança e disponibilidade sempre quando precisei.

Ao Prof Claudio Rossi pelo apoio incondicional e direção do trabalho, por compartilhar seus conhecimentos, meu eterno respeito e admiração pelo brilhante profissional, sem ele tudo se tornaria mais difícil.

À Prof<sup>a</sup> Dra Raquel Stucchi pelas sugestões e esclarecimentos no decorrer do trabalho e pela amizade.

À Prof<sup>a</sup> Dra Elza Cotrim pela força, sugestões e amizade.

À Prof<sup>a</sup> Dra Marilda Mazzali contribuição e partilha de conhecimentos.



Ao Prof Claudio Panutti (USP) pelos esclarecimentos e oportunidade.

À Prof<sup>a</sup> Clarice Machado (USP) pela atenção e oportunidade do estágio.

À cirurgiã Dr<sup>a</sup> Elaine Ataíde pela contribuição na captação de amostras.

Aos anestesistas Dr<sup>a</sup> Derli Munhoz, Dr<sup>a</sup> Emica Simozomo e Dr Adilson Roberto, pela contribuição e amizade.

À equipe da Unidade de Transplante de Fígado, as enfermeiras Elizabete e Fátima, a assistente social Cristina, as psicólogas Ana Maria e Izabel, a fisioterapeuta Auria, a secretária Deuza, pelo convívio nesses anos.

Ao Corpo de Enfermagem da Gastroclínica, Gastrocirurgia, UTI e Centro Cirúrgico pela comunicação, ajuda na captação das amostras.

À equipe do Laboratório Hepatologia e Bacteriologia do Gastrocentro, Nanci Nishimura, Natália Hara e Elizabete Gonçalves, pelo acolhimento, apoio sempre prestados, e pela amizade que nasceu e se solidificou.

À Célia Pavan pelo apoio em procedimentos de coletas e à Helena Akasaka pelas orientações.

À equipe do Laboratório da Nefrologia (Antigenemia), Fabiana, Patricia e Soemys pelo apoio e partilha de experiências e, sobretudo pela amizade.

À equipe do Laboratório de Antigenemia do Instituto de Medicina Tropical/USP, Will, Lucy, Cintia e Cristina, pelo acolhimento e partilha de conhecimentos.

À Lisandra Akemi Suzuki do Laboratório de Imunologia, pela ajuda nos procedimentos técnicos da sorologia.

Ao Departamento de Comissão da Pós Graduação: Denise, Márcia Sabino, Renata, Roberto, Marcinha, Cristiane por todo apoio sempre prestados.





À Juliana secretária do Departamento de Pós Graduação em Cirurgia, pelas orientações burocráticas.

Ao Órgão Financiador Capes pelo auxílio da bolsa pesquisa.

À querida amiga Paula ex-secretária do Departamento da Pós-Graduação em Cirurgia, pela orientação, auxílio em momentos necessários.

Aos funcionários do Gastrocentro, em especial à D. Fátima, ao Martin, ao Sinvalter, à enfermeira Marina Célia e à Raquel, funcionária do terminal de limpeza, meu muitíssimo obrigada pela amizade e apoio prestados.

À funcionária Maria Cristina Pirra, do departamento financeiro do gastrocentro, pelas sugestões na construção das tabelas.

À pós-graduanda Arlete Milan, sempre comprometida com o trabalho desde a ajuda na organização operacional do laboratório, quanto pela partilha, sempre disposta, fora de horários para captação e análises das amostras.

À pós-graduanda Ana Carolina Guardia da Silva, pela participação na escrita de trabalhos.

Às amigas-irmãs Anali Torina e Aline Torina, por todo o respeito que esteve sempre presente e que foram desprendidos de qualquer outro interesse, apenas a verdadeira amizade, mesmo quando eu não tinha nada a oferecer. Amo demais!!!

À Elisa Boin, por todo apoio na parte estatística, estrutura do trabalho e tranquilidade que me passou, assim como por me fazer sorrir nos momentos de desesperos... meu enorme carinho e gratidão.

À Família Boin, pelo acolhimento e atenção sempre prestados!

À Família Mondini, Sr. Rubens e Tereza, Maria Tereza, André Luis, Adriana e Marco Aurelio, por todo carinho.



Às amigas sempre muito presentes em meu coração, Fernanda Costa, Bruna Roesler, Daniela Parola, Beatriz Bismara, Sheila Kallas, Glauca Marcon, Glauce Rejane Santos, Daniela Marin e Camila Carvalho.

Às amigas Eliana Duarte, Rosemara Veiga, Kátia Colomina, Marcia Colomina e Tânia Colomina sempre presentes, anos de amizade e cumplicidade.

Aos amigos Inês e Roberto Pires, Rita e Celso Rigon, Larissa Rigon e João Pedro Pires, pela torcida e presença no meu dia à dia.

Ao Guilherme Santiago Corozola, pela companhia, amizade e atenção ao meu filho Gabriel nos últimos momentos que estive mais ausente.

À grande amiga Regina Costa e família, pelas orações e partilha de experiências.

Aos meus amigos da Igreja Vila Maria de Bragança Paulista, Marcelo, Maria José e João, pelas orações que foram fundamentais para meu fortalecimento espiritual.

Ao padre Jocelir, pelas lindas palavras tão iluminadas, que foram um grande incentivo no ano de 2011.



*De tudo ficaram três coisas.  
A certeza de que estamos começando  
A certeza de que é preciso continuar  
A certeza de que podemos ser interrompidos  
antes de terminar  
Façamos da interrupção um caminho novo  
Da queda, um passo de dança  
Do medo, uma escada  
Do sonho, uma ponte  
Da procura, um encontro!*

(Fernando Sabino)





# RESUMO





O herpes vírus humano HHV-6 e HHV-7 pertencem à subfamília herpes virinae, família herpes viridae, são vírus universais e após infecção primária permanecem latentes no organismo, podendo ser reativados por período de imunossupressão. O objetivo da pesquisa visou a padronização e implantação da antigenemia para diagnóstico precoce de HHV-6 e HHV-7 e a realização da sorologia para HHV-6 em pacientes submetidos ao transplante de fígado do Hospital das Clínicas da Unicamp. A partir dos dados obtidos da antigenemia para HHV-6 e HHV-7, avaliou com os achados de antigenemia do HCMV, N-PCR para HCMV, HHV-6, HHV-7 e outros aspectos clinico-laboratoriais. O protocolo foi seguido de acordo com os requerimentos para pesquisas e foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Conseguiu-se para o estudo amostras de 32 pacientes, com idade mediana de 47 (18-66) anos, sendo 20 (62,5%) do sexo masculino e 12 (37,5%) do sexo feminino. A monitorização dos pacientes foi realizada prospectivamente desde o pré-transplante e no pós-transplante, de modo semanal no 1º e 2º, quinzenal no 3º mês e mensal do 4º mês até o final do 6º mês. A partir de linfócitos extraídos de sangue periférico realizou-se a detecção de antígenos de HHV-6 com anticorpos monoclonais C65206M (marca Biodesign International, France) e MAB8535 (marca Biodesign International - USA) e conjugados de soro de coelho anti-IgG de camundongo Z0412-1 (marca Dako - CA, USA) e soro de cabra anti-IgG de coelho marcado com peroxidase 81-6120 (marca Zymed, CA, USA). Para a detecção de antígenos de HHV-7 foi utilizado o anticorpo monoclonal de rato KR4 (marca Advance Biotechnologies, Canada), conjugado soro de coelho anti-imunoglobulina de camundongo P0260 (marca Dako Cytomation, USA) e conjugado soro de cabra anti-IgG de coelho 81-6120 (marca Zymed, CA, USA) diluídos em PBS/BSA e aplicados sobre a fixação celular. Foi realizado a detecção de anticorpos IgM anti HHV-6 pelo teste de Elisa (marca Panbio, USA). Com essas metodologias a detecção de IgM anti HHV-6 foi

positiva em 15,6% dos pacientes no pré transplante, 25% na quarta semana, 40,6% na 12 semana e em 46,9% na 24 semana após o enxerto. A antigenemia para HCMV, HHV-6 e HHV-7 foi positiva em 46,9%, 62,5% e 46,8% respectivamente. A N-PCR para HCMV e HHV-6 ocorreu em 81% dos casos, e para HHV-7 foi de 46,8%. Detectou-se que 50% dos pacientes estudados tiveram doença por HCMV. A doença causada pelo HHV-6 foi em 46,8% dos pacientes e em 15,6% para HHV-7. A concomitância de doenças foi observada nos pacientes com HCMV e HHV-6 em 21,9% e em 15,6% dos pacientes com HHV-6 e HHV-7. A doença causada pelos beta herpes vírus foi detectada com maior frequência ao redor da quinta semana. E os episódios de doença para HHV-6 e HHV-7 surgiram antes do aparecimento da doença por HCMV. Este estudo confirma a relevância da infecção pelo HCMV, HHV-6 e HHV-7 e a importância do monitoramento através de técnicas para a detecção precoce desses agentes, possibilitando a utilização de um tratamento preemptivo, com redução do risco de doença.



# **ABSTRACT**



**Introduction:** The human herpes viruses type 6 (HHV-6) and 7 (HHV-7) belong to the herpes virus subfamily, herpes viridae family, are universal viruses and after primary infection remain latent in the organism and may be reactivated during an immunosuppression period. The aims of the research were to standardize, implement and monitor antigenemia for early diagnosis of HHV-6 and HHV-7 and serology for HHV-6 in patients who underwent liver transplantation in the Hospital of the State University of Campinas. The data obtained for HHV-6 and HHV-7 antigenemia were correlated with results for HCMV, N-PCR for HCMV, HHV-6, HHV-7 and other clinical and laboratorial aspects. The protocol was followed according to the research requirements and was approved by the Institutional Ethics Committee of the State University of Campinas. Thirty-two patients were studied, mean age 47 (18-66) years old, in which 20 (62.5%) were male and 12 (37.5%) were female. The monitoring of the patients was carried out prospectively since pre-transplantation and during post-transplantation period; weekly in the first and second month, fortnightly in the third month and monthly up to the sixth month. Detection of HHV-6 antigens was held from lymphocytes extracted from peripheral blood using monoclonal antibodies C65206M (Biodesign International, France) and MAB8535 (Biodesign International-USA); rabbit anti-mouse IgG Z0412-1 (Dako, USA) conjugate serum and goat anti-rabbit marked with peroxidase IgG 81-6120 (Zymed, USA) conjugate serum. For HHV-7 antigens detection, KR4 (Advance Biotechnologies, Canada) mouse monoclonal antibody, conjugate P0260 (Dako Cytomation, USA) rabbit anti-mouse IgG serum and conjugate goat anti-rabbit IgG serum 81-6120 (Zymed, USA) were used, diluted in PBS/BSA and applied over the cell fixation. IgM anti HHV-6 antibody detection was held by ELISA test (Panbio, USA). Using this methodology IgM anti HHV-6 detection was positive for 15.6% of the patients in pre-transplantation, 25% in the fourth week, 40,6% in the twelfth week and 46,9% in the 24th week after the transplantation. HCMV, HHV-6 and HHV-7 antigenemia was positive in

46.9%, 62.5% and 46.8%, respectively. HCMV and HHV-6 PCR occurred in 81% of the cases and for HHV-7, 46.8% of the cases. It was detected that 50% of the patients manifested HCMV disease. Disease manifested in 46.8% and 15.6% of the patients for HHV-6 and HHV-7, respectively. Concomitance of the diseases was observed in patients with HCMV and HHV-6 in 21.9% and 15.6% of the patients with HHV-6 and HHV-7. The disease caused by beta herpes virus was detected with higher frequency around the fifth week. HHV-6 and HHV-7 disease episodes appeared prior to HCMV disease. This study confirms the relevance of HCMV, HHV-6 and HHV-7 infection and the importance of monitoring through techniques for early detection of these agents, allowing the usage of a preemptive treatment, reducing the risk of disease.

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>AGM</b>	Antigenemia
<b>AIDS</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>CD4</b>	Marcador de Superfície de Linfócito T Auxiliar
<b>CD8</b>	Marcador de Superfície de Linfócito T Citotóxico
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>E</b>	Fase precoce do ciclo de replicação do HCMV
<b>EA</b>	Antígenos precoces (“Early antigens”)
<b>EBV</b>	Epstein-Barr Vírus
<b>EDTA</b>	Ácido etileno diamino tetracético
<b>ELISA</b>	Ensaio Imunoenzimático
<b>g</b>	Gramas
<b>HBV</b>	Vírus da Hepatite B
<b>HCV</b>	Vírus da Hepatite C
<b>HCMV</b>	Herpes vírus Humano (citomegalovírus)
<b>HHV-6 A</b>	Herpes vírus Humano Tipo 6 Variante A
<b>HHV-6 B</b>	Herpes vírus Humano Tipo 6 Variante B





<b>HHV-7</b>	Herpes vírus Humano Tipo 7
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>IEA</b>	Antígenos imediatamente precoces
<b>IgG</b>	Imunoglobulinas da classe G
<b>IgM</b>	Imunoglobulinas da classe M
<b>L</b>	Fase tardia do ciclo de replicação do HCMV
<b>LA</b>	Antígenos Tardios (“Late antigens”)
<b>N-PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase ou dupla PCR
<b>RT-PCR</b>	PCR em Tempo Real
<b>PB</b>	Pares de bases
<b>TOF</b>	Transplante ortotópico de fígado
<b>VPP</b>	Valor preditivo positivo
<b>VPN</b>	Valor preditivo negativo
<b>RV</b>	Verossimilhança



	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1-</b> Vírus do grupo herpes que infectam humanos.....	55
<b>Tabela 2-</b> Casos de doenças diagnosticadas (S) e concomitância de doença (mesma amostra) de acordo com a semana (S1 a S24) de coleta.....	121
<b>Tabela 3-</b> Sensibilidade, especificidade, valores preditivo positivo e negativo teste de acurácia, prevalência e razão de verossimilhança (RV) dos testes HCMV (citomegalovirus), HHV-6 (human herpes vírus 6) e HHV-7 (human herpes vírus 7) de acordo com a técnica realizada.....	122



	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1-</b> Estrutura Morfológica dos herpes vírus.....	57
<b>Figura 2-</b> Representação esquemática da replicação viral.....	63
<b>Figura 3-</b> Fotomicrografia ótica de linfócitos positivos para antígenos do HHV-6 (A) e HHV-7 (B) (antigenemia) detectados no estudo.....	118
<b>Figura 4-</b> Número de episódios de positividade dos exames de sorologia IgG (imunoglobulina G), N-PCR (nested protein reaction) e AGM (antigenemia) para HCMV (citomegalovirus) de acordo com a semana de coleta.....	123
<b>Figura 5-</b> Número de episódios de positividade dos exames de sorologia IgM (imunoglobulina M), N-PCR (nested protein reaction) e AGM (antigenemia) para HHV-6 (human herpes vírus 6) de acordo com a semana de coleta.....	124
<b>Figura 6-</b> Número de episódios de positividade dos exames N-PCR (nested protein reaction) e AGM (antigenemia) para HHV-7 (human herpes vírus7) de acordo com a semana de coleta....	125
<b>Figura 7-</b> Número de episódios de doença viral detectada de acordo com a semana de coleta (HCMV=citomegalovirus; HHV-6=human herpes vírus 6; HHV-7=human herpes vírus 7).....	125
<b>Figura 8-</b> Número de episódios de doença concomitantes (co-infecção) detectadas de acordo com a semana de coleta (HCMV=citomegalovirus; HHV-6=human herpes vírus 6; HHV-7=human herpes vírus 7).....	126



	<b>Pág.</b>
<b>RESUMO</b> .....	xxiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xxvii
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	47
<b>1.1- Histórico dos transplantes de órgãos</b> .....	49
<b>1.2- Histórico da subfamília beta herpes vírus</b> .....	51
<b>1.3- Características estruturais da subfamília beta herpes vírus</b> ....	54
1.3.1- Citomegalovírus humano (HCMV).....	56
1.3.2- Herpes vírus humano Tipo 6 (HHV-6).....	58
1.3.3- Herpes vírus humano Tipo 7 (HHV-7).....	60
<b>1.4- Mecanismo de Replicação do HCMV, HHV-6 E HHV-7</b> .....	61
1.4.1- Citomegalovírus humano HCMV.....	62
1.4.2- Herpes vírus humano Tipo 6 (HHV-6).....	64
1.4.3- Herpes vírus humano Tipo 7 (HHV-7).....	65
<b>1.5- Transmissão e epidemiologia do HCMV, HHV-6 E HHV-7</b> .....	66
<b>1.6- Manifestações clínicas de HCMV, HHV-6 E HHV-7</b> .....	69
1.6.1- Manifestação clínica de HCMV.....	69
1.6.2- Manifestações Clínicas de HHV-6.....	72
1.6.3- Manifestações Clínicas de HHV-7.....	74





<b>1.7- Diagnóstico laboratorial.....</b>	<b>75</b>
1.7.1- Técnicas citopatológicas e histopatológica.....	76
1.7.1.1- Técnicas citológicas.....	76
1.7.1.2- Técnicas histológicas.....	76
1.7.2- Isolamento viral.....	77
1.7.2.1- Isolamento Viral HCMV.....	77
1.7.2.2- Isolamento Viral HHV-6.....	77
1.7.2.3- Isolamento Viral HHV-7.....	78
1.7.3- Métodos Sorológicos.....	78
1.7.3.1- Imunoensaio enzimático por Elisa.....	79
1.7.3.2- Imunofluorescência (IF).....	80
1.7.3.3- Método de avidéz para detecção de anti HHV-7.....	82
1.7.3.4- Método Western Blot para HHV-7.....	82
1.7.4- Detecção de antígenos virais (Antigenemia).....	83
1.7.4.1- Antigenemia para HCMV.....	83
1.7.4.2- Antigenemia para HHV-6 e HHV-7.....	84
1.7.5- Métodos moleculares.....	85
1.7.5.1- Detecção de ácidos nucléicos.....	85
1.7.5.2- Reação em cadeia da polimerase (N-PCR).....	86
1.7.5.3- Nested PCR (Reação Dupla em Cadeia da Polimerase).....	87
1.7.5.4- PCR em tempo real (REAL-TIME PCR).....	89



<b>2- OBJETIVOS.....</b>	<b>91</b>
<b>2.1- Principal.....</b>	<b>93</b>
<b>2.2- Secundários.....</b>	<b>93</b>
<b>3- CASUÍSTICA.....</b>	<b>95</b>
<b>3.1- Critérios de inclusão no estudo.....</b>	<b>97</b>
<b>3.2- Critérios de exclusão.....</b>	<b>97</b>
<b>3.3- População de estudo.....</b>	<b>98</b>
<b>3.4- Definição de conceitos.....</b>	<b>99</b>
3.4.1- Critérios para diagnóstico de infecção ativa de HCMV.....	99
3.4.2- Critérios para diagnóstico de infecção ativa pelo HHV-6.....	100
3.4.3- Critérios para diagnóstico de infecção ativa pelo HHV-7.....	100
3.4.4- Critérios para diagnóstico de co-infecção por HCMV, HHV-6 e HHV-7.....	100
3.4.5- Critérios para caracterizar doença por HCMV.....	100
3.4.6- Critérios para caracterizar provável doença por HHV-6.....	101
3.4.7- Critérios para caracterizar provável doença por HHV-7.....	102
3.4.8- Critérios para caracterizar a infecção bacteriana concomitante.....	102
3.4.9- Critérios para caracterizar a primo-infecção.....	102
<b>3.5- Critérios para definir a disfunção e a rejeição do enxerto.....</b>	<b>103</b>



<b>4- MÉTODOS.....</b>	<b>105</b>
<b>4.1- Implantação da antigenemia para HHV-6 e HHV-7.....</b>	<b>107</b>
4.1.1- Separação celular.....	107
4.1.2- Fixação celular para HHV-6 e HHV-7.....	108
4.1.3- Reação monoclonal para HHV-6.....	109
4.1.4- Reação monoclonal para HHV-7.....	110
4.1.5- Interpretação da leitura (HHV-6 e HHV-7).....	111
<b>4.2- Sorologia por técnica da imunoperoxidase IgM Elisa para HHV-6.....</b>	<b>111</b>
4.2.1- Pré-diluição e absorção do soro.....	112
4.2.2- Aplicação das amostras na placa de Elisa.....	112
4.2.3- Leitura da placa de Elisa.....	112
4.2.4- Cálculos e interpretação dos resultados.....	113
<b>4.3- Análise estatística.....</b>	<b>113</b>
<b>4.4- Apoios recebidos.....</b>	<b>113</b>
<b>4.5- Referências bibliográficas.....</b>	<b>113</b>
<b>5- RESULTADOS.....</b>	<b>115</b>
<b>6- DISCUSSÃO.....</b>	<b>127</b>
<b>7- CONCLUSÃO.....</b>	<b>141</b>
<b>8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>145</b>
<b>9- ANEXOS.....</b>	<b>165</b>





# 1- INTRODUÇÃO





## 1.1- Histórico dos transplantes de órgãos

Os programas de transplantes de órgãos tiveram início no final da década de 1940, em Paris, Londres, Edimburgo e Boston. Em 1954, foi realizado o primeiro transplante renal com sucesso, por Joseph Murray, na cidade de Boston, com gêmeos idênticos.

E o primeiro transplante hepático realizado pela primeira vez foi no ano de 1955 pela técnica heterotópica, em que o fígado do doador foi colocado no abdômen inferior e o fígado do receptor foi deixado em sua posição original.

O primeiro transplante ortotópico, em que o fígado do doador substitui o do receptor, foi realizado em cães nos laboratórios de Moore, em Boston, e Starzl, em Chicago no ano de 1959 e 1960 (Ringe, 1994).

Até a década de 70 não existiam perspectivas de tratamento para pacientes com doenças de fígado em estágio avançado. Dispunham-se apenas de medidas paliativas, que eram capazes de diminuir o sofrimento do indivíduo durante a fase final da evolução da doença. Entretanto o transplante de fígado abriu perspectivas animadoras, representando, o maior progresso da hepatologia moderna.

Nos anos seguintes os esforços foram no sentido de superar problemas de rejeições no pós-operatório com desenvolvimento de drogas com melhor ação imunossupressora e expressivos efeitos colaterais, tais como a nefrotoxicidade, hipertensão arterial, neurotoxicidade, hiperglicemia, neoplasias, infecções, hiperlipidemia e hiperpotassemia.

O aumento de sobrevida pós-transplante hepático ocorreu em 1978 em Cambridge com o grupo liderado por Roy Calne onde foram introduzidos novos agentes imunossupressores para controle de rejeição (Starzl et al., 1981).

Na década de 80 com o surgimento da ciclosporina que representava menor efeito colateral transformou contribuiu muito para o sucesso dos transplantes, que passou de uma simples curiosidade, para uma terapia efetiva

(Lamb, 2000; Schafer, 2001). Esta década foi um marco na era dos transplantes, pois representou uma época com surgimento de vários eventos, tais como; novas drogas imunossupressoras, a ciclosporina e tacrolimus.

Outro fator importante foi a padronização nas retiradas múltiplas dos órgãos dos doadores cadáveres e o desenvolvimento por Belzer de uma nova solução de conservação para os órgãos.

Todos estes avanços permitiram obter resultados encorajadores nos serviços de transplantes do rim, coração e fígado proporcionando uma sobrevivência de até 80% após dois anos do enxerto (Pereira, 2004).

Embora o transplante não representasse a cura, ele proporcionava esperança, ao mesmo tempo receio por trazer consigo a ansiedade da rejeição, especialmente porque se tratava de um procedimento em fase experimental, mas a esperança, freqüentemente é a parte da condição humana.

Assim os serviços de transplantes foram se tornando cada vez mais solidificados, e no Brasil o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo USP, realizou várias tentativas por duas equipes diferentes (Raia, 1969). Foi a pioneira no transplante de fígado na América Latina, realizado em 1º de setembro do ano anterior, 1984.

O serviço de transplante da Unidade de Fígado do HC da Unicamp iniciou sua fase experimental em cães e porcos, no Núcleo de Cirurgia Experimental e Medicina da Unicamp no ano de 1989. E somente em 1991 foi realizado com sucesso o primeiro transplante ortotópico de fígado em paciente de sexo masculino portador de Hepatite C.

Até a presente data a Unidade de Transplante de Fígado da Unicamp já realizou mais de 550 transplantes de fígado e outros tipos de transplantes realizados por outras equipes da Unicamp já totalizam mais de 5.000.

O Hospital das Clínicas da Unicamp está entre os hospitais que mais realizam esses procedimentos de transplantes de órgãos no país, é um dos 10 no estado de São Paulo e o que mais realiza procedimentos no interior, com destaque para rins e fígado.

Após todas as experiências por vários serviços no mundo o transplante de fígado passou de um procedimento experimental para uma modalidade a terapêutica de escolha no tratamento das doenças crônicas ou agudas, que possibilita a reversão do quadro terminal de um paciente com doença hepática. É utilizado como recurso para pacientes portadores de lesão hepática irreversível, quando mais nenhuma outra forma de tratamento se encontra disponível.

Estes breves históricos descritos anteriormente sobre a evolução dos transplantes no mundo trazem consigo uma nova classe de pacientes, e simultaneamente novos desafios à prática médica com a emergência de quadros clínicos relacionados ao tratamento pós-transplante.

Alguns destes desafios são as infecções virais, que estão relacionadas com grande número de morbidade e mortalidade nesses pacientes, sendo amplamente disseminadas. Estas infecções são causadas por diversos vírus, dentre eles os herpes vírus, que têm sido relatados por vários grupos de pesquisa como sendo os responsáveis por diversas síndromes nos transplantados.

## **1.2- Histórico da subfamília beta herpes vírus**

A descoberta do Citomegalovírus Humano (HCMV) teve início em 1881, quando, pela primeira vez, os efeitos histológicos da infecção foram observados no rim de uma criança recém-nascida. Em 1904 identificado por Ribbert ao agente etiológico da "Doença de Inclusão Citomegálica", cuja denominação deriva-se do efeito citopático característico, representado pelo aumento dos volumes celulares

pôr inclusões intracelulares e citoplasmáticas observadas nos tecidos infectados (Maya et al., 2000).

Desde 1881 e em 1921 células características semelhantes foram reportadas por Goodpasture e Talbot em um caso fatal associado a esse vírus envolvendo pulmão, fígado e rim de uma criança recém-nascida (Drew, 1988).

A primeira evidência experimental do provável agente etiológico da "Doença de Inclusão Citomegálica" foi proposta por Cole & Kuttner em 1926, quando demonstraram a transmissão da doença em cobaias e sugeriram que este agente possuía características de vírus.

O trabalho de Farber & Wolbach (1932) mostrou a primeira evidência de que o vírus de glândula salivar era relativamente frequente e demonstraram ter encontrado células citomegálicas típicas em 12% de crianças estudadas. Em 1954, usando a infecção salivar de camundongo como modelo, Smith conseguiu isolar o vírus em cultura de tecidos (Smith et al., 1997).

Em 1956/57, o isolamento do citomegalovírus humano ocorreu quase que simultaneamente pôr três pesquisadores: Smith em St. Louis, Rowe em Bethesda e Weller em Boston, que utilizaram técnicas de cultura celular em amostras de urina e tecido de crianças com provável infecção causada pelo vírus (Smith et al., 1997).

Em 1970 foram organizados grupos de estudo para avaliar o impacto da infecção em imunocomprometidos e através disto propor estratégias para o controle da infecção. Na década de 1980 iniciaram-se as medidas de controle do HCMV com os agentes antivirais e intervenções imunológicas, e atualmente os avanços para se compreender infecções causadas por este vírus estão relacionadas aos aspectos de detecções laboratoriais e clínicos, principalmente nos pacientes considerados grupos de risco (Costa, 1999).

Em 1910, foi descrito por Zahorsky apresentação clínica do exantema súbito, porém, nessa época ainda não se conhecia o agente causador da doença.

Somente em 1941, em um estudo prospectivo de pacientes que apresentavam exantema súbito, foi então levantada a hipótese de que poderia ser um vírus o agente causador da doença.

Em 1986 o HHV-6 foi isolado pela primeira vez a partir de células mononucleares de sangue periférico de pacientes adultos com desordens linfoproliferativas (Leach et al., 2002; Sashihara et al., 2002; Taniguch et al., 2000; De Bolle L et al., 2005), e de pessoas com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Braun et al., 1997) e subsequentemente nomeado de vírus linfotrófico B humano (HBLV), pois parecia apresentar um tropismo pelo linfócito B (Santos, 2000).

Em 1987 após análise de microscopia eletrônica do genoma do HBLV, foi revelado as características morfológicas consistentes e chegou-se a conclusão que este agente se distinguia de outros herpes vírus humanos e foi designado Herpes Vírus Humano Tipo 6 (HHV-6), ficando de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (Braun et al., 1997).

No Japão em 1988, ocorreu a primeira publicação correlacionando doença clínica com HHV-6, na qual demonstrou-se a soroconversão para este vírus em crianças com diagnóstico clínico de exantema súbito à partir de cultura celular em sangue periférico (Santos, 2000).

Em 1993 Ablashi et al, reconheceram oficialmente duas variantes de HHV-6, sendo a variante A e B (HHV-6A e HHV-6B) que apresentam características biológicas, imunológicas, epidemiológicas e moleculares bem distintas. O genoma completo das duas variantes só foi determinado em 1995 para a variante A e em 1999 para a variante B (Gomplex et al., 1995; De Bolle L et al., 2005).

O HHV-7 foi isolado pela primeira vez em 1990 e tem sido relacionado a processos exantemáticos em crianças (Exantema súbito ou *Roseola infantum*), encefalopatia e encefalites quando acomete pacientes transplantados (Frenkel et al., 1990; Ward, 2005; Razonable et al., 2002).

Assim como HHV-6 o HHV-7 também causa síndromes infecciosas comuns na infância, conhecido como exantema súbito (Tong et al., 2000). O HHV-7 integra seu material genético (DNA) em células linfoides do hospedeiro conduzindo a uma infecção latente controlada eficazmente, pelo sistema imune em pacientes imunocompetentes. No caso de pacientes imunossuprimidos pode se reativar e, em associação com outros herpes vírus causar danos tanto ao órgão transplantados, como ao estado geral do paciente (Lautenschlager et al., 2002; Scott et al., 2011).

Estudos recentes têm sugerido que a associação entre o HHV-7 e HCMV pode elevar o nível de imunossupressão e aumentar a incidência de rejeição, possivelmente devido a uma potencialização do efeito do HCMV ou modulação do sistema imune do receptor (Tong et al., 2000; Scott et al., 2011).

Esta imunomodulação pode predispor a outras infecções oportunistas como invasão fúngica (Griffiths, 2000; Razonable et al, 2002). Ao longo do tempo os estudos e observações *in vivo* e *in vitro* tornaram evidente a importância do HHV-6 e do HHV-7 como patógenos ou co-patógenos após transplante de órgãos. Vários estudos atualmente têm relatado que HHV-6 e HHV-7 juntos com HCMV podem ocasionar grande impacto clínico nos pacientes após enxerto (Lautenschlager et al., 2006; Scott et al., 2011).

O Herpes vírus Humano 6 (HHV-6) e Herpes vírus Humano 7 (HHV-7) estão intimamente relacionados com base no tropismo celular e características semelhantes de crescimento (Yoshikawa, 2003)

### **1.3- Características estruturais da Subfamília beta herpes vírus**

Os herpes vírus têm estruturas semelhantes, com tamanhos que variam de 120 a 200nm de diâmetro. Apresentam 4 elementos estruturais principais, um nucleocapsídeo icosaédrico com capsômeros protéicos; estrutura protéica eletrodensa contendo o DNA viral; um envelope derivado da membrana celular

contendo glicoproteínas virais e proteínas integrais, e um tegumento, localizado entre o núcleo capsídeo e o envelope (Brennan, 2001).

O trabalho de Ferreira e Souza (2002) descreve os herpes vírus pertencentes à família *Herpes viridae* composta por oito espécies de importância médica, sendo cada grupo deles pertencentes as suas respectivas subfamílias.

O Herpes vírus Humano HCMV, Herpes vírus Humano Tipo 6 e Herpes vírus Humano Tipo 7 pertencem a sub-família *Beta herpes virinae* ( $\beta$ -herpes virinae), o Herpes vírus Humano Tipo 8 (HHV-8) e Epstein Barr vírus ou HHV-4 da subfamília *Gamma herpes virinae* ( $\gamma$ -herpes virinae) e os Hesperes vírus Humano 1 e 2 (HVS-1) e (HVS-2) pertencem a subfamília *Alpha herpes virinae* ( $\alpha$ -herpes virinae). A Tabela 1 ilustra os vírus do grupos herpes da familia *Herpes viridae* de interesse médico.

**Tabela 1-** Vírus do grupo herpes que infectam humanos

Vírus	Sinônimo	Sub-família	Abreviação
Herpes vírus Humano-1	Herpes simplex-1	$\alpha$	HSV-1/HHV-1
Herpes vírus Humano-2	Herpes simplex-2	$\alpha$	HSV-2/HHV-2
Herpes vírus Humano-3	Varicella-zoster	$\alpha$	VZV/HHV-3
Herpes vírus Humano-4	Epstein-Barr	$\gamma$	EBV/HSV-4
Herpes vírus Humano-5	Citomegalovírus	$\beta$	HCMV/CMV/HHV-5
Herpes vírus Humano-6	Não há	$\beta$	HHV-6
Herpes vírus Humano-7	Não há	$\beta$	HHV-7
Herpes vírus Humano-8	Não há	$\gamma$	KSHV/HHV-8

Os alfa herpes vírus têm crescimento rápido, costumam infectar as células epiteliais e desenvolver seu sítio de latência nos neurônios.

Os beta herpes vírus são de crescimento lento, infectam células e tornam-se latentes numa variedade de tecidos.

Os gama herpes vírus, ao infectarem, tornam-se latentes nas células linfóides (Levinson et al., 2000).

### 1.3.1- Citomegalovírus Humano (HCMV)

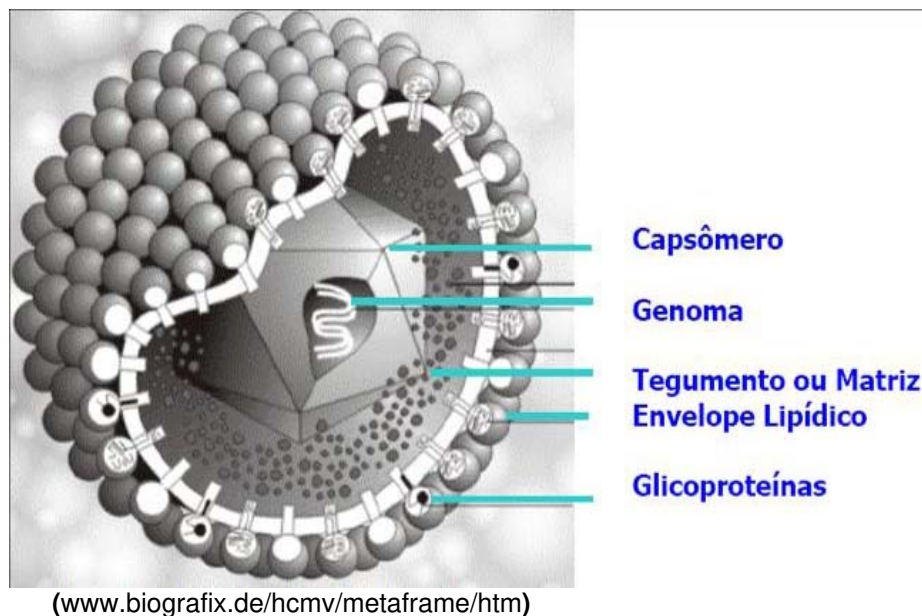
O Citomegalovírus Humano possui ultra-estrutura semelhante à de outros herpes vírus, comprovado por microscopia eletrônica, por isso é também conhecido como Herpes vírus Humano Tipo 5 (HHV-5). Essa classificação de HCMV é baseada em propriedades biológicas de especificidade ao hospedeiro, ciclo de replicação e efeitos citopáticos em geral. Tem sido isolado em diferentes vertebrados, dentre eles; camundongos, macacos e os homens (Mustafa, 1994).

Como todos os herpes vírus possuem quatro elementos estruturais: um core elétron-denso, um capsídeo com simetria icosaédrica, um tegumento ocupando espaço entre capsídeo, e um envelope embebido por glicoproteínas e proteínas de membranas (Braun et al., 1997).

O HCMV é composto por uma cadeia dupla de DNA (ácido desoxirribonucléico) linear contendo aproximadamente 240kb (Brennan, 2001) que codifica 33 proteínas estruturais e um número indefinido de proteínas não estruturais, sendo algumas delas conhecidas por serem imunogênicas e desencadearem resposta humoral específica. Tem genoma extremamente grande, com comprimento estimado de 65-68nm, e pode ser dividido em dois segmentos, denominados componente longo (L) e curto (S), com possibilidade de sofrerem inversão durante a replicação. Os segmentos estão delimitados por sequências repetitivas terminais (TR). A junção entre os componentes L e S é composta de sequências repetitivas internas (IR) e são designadas IR-L e IR-S, quando ligadas aos componentes L e S respectivamente. A sequência entre as regiões repetidas são únicas (U) e denominadas como U-L e U-S. O HCMV tem maior complexidade genômica do que outros herpes vírus, devido à ocorrência de várias aquisições e duplicações gênicas (Levinson et al., 2000).



Quando as fitas de DNA do vírus são desnaturadas, tendem a se anelar e formar “loop”, indicando que as moléculas possuem dois pares de repetições invertidas subdividindo o genoma em um segmento grande, correspondendo a uma única região (UL, 174kpb) a qual está inserida entre repetições invertidas (IRL/TRL) e um segmento pequeno (US), que é uma sequência única de 35,6kpb flanqueada por repetições curtas invertidas (IRS/TRS) (Levinson et al. 2000, Landolfo et al., 2003). Foi observado recentemente que o RNA era purificado das partículas virais, este mecanismo da expressão gênica dos herpes vírus permite que os genes virais sejam expressos no interior da célula infectada imediatamente após a entrada viral e na ausência de transcrição do genoma viral. Não se tem ainda um conhecimento da função destas proteínas codificadas por esse RNA (Levinson et al., 2000). O vírion completo mede entre 180 e 250nm de diâmetro; possui um envelope glicolipídico que envolve toda estrutura viral, um capsídeo icosaédrico de 110nm, com 162 capsômeros que envolvem o núcleo composto por DNA de dupla hélice com 240kb (Levinson et al., 2000).



**Figura 1-** Estrutura Morfológica dos herpes vírus

O HCMV é bastante termolábil e sua vida média a 37°C é de apenas 45 minutos, sendo totalmente inativado a 56°C durante 30 minutos (Rowshani, 2005)

Para ocorrer o início da infecção na célula, é necessário que o vírus seja adsorvido aos receptores de superfície celular e haja fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática celular. Posteriormente, o capsídeo é transportado para os poros nucleares e o DNA é liberado no núcleo celular, onde ocorrem a transcrição do DNA viral e produção de novos capsídeos (Silva, 2000).

Durante a infecção natural, a replicação do vírus pode ocorrer em células epiteliais, endoteliais, musculares, mesenquimais, hepatócitos, granulócitos e macrófagos (Gerna et al., 2000)

Estudos *in vivo* com células de pacientes imunocompetentes e imunossuprimidos mostram que os leucócitos polimorfo nucleares são as células sanguíneas mais frequentemente infectadas pelo HCMV (Bonon et al., 2005) e representam importante sítio de replicação (Gerna, et al., 2000; Rowshani, 2005).

### 1.3.2- Herpes vírus humano Tipo 6 (HHV-6)

O herpes vírus humano (HHV-6) está intimamente relacionado com citomegalovírus humano. Foi descoberto em 1986 e tem estudos relacionados a este vírus tem se expandido consideravelmente nos últimos 10 anos. A descoberta do receptor CD46 tem esclarecido melhor os aspectos que envolvem o tropismo celular de HHV-6.

O HHV-6 difere dos outros herpes vírus por suas propriedades antigênicas e seu conteúdo genético, apresenta duas variantes (6<sup>a</sup> e 6B) (Razonable et al., 2009, Loginov et al., 2010; De Bolle L et al., 2005).

Apesar das duas variantes possuírem 90% de similaridade em suas sequências de nucleotídeos, elas apresentam características biológicas, genéticas e imunológicas distintas (Dockrell, 2003). A maioria dos sintomas ocasionados por infecção pelo HHV-6, incluindo *roseola infantum*, têm sido associados à variante B e as alterações neurológicas (Singh N et al., 2000), associadas a variante A, (Razonable, 2009), sendo a segunda mais prevalente em indivíduos infectados com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (Viana et al., 2002). O HHV-6 A demonstra maior virulência com a imunossupressão, comparado a variante B (Razonable e Paya, 2002).

O genoma do HHV-6 contém 160-162kb, com uma região central única (U) de 143-144kb, contendo estruturas de leitura aberta (ORFs) U1-100. Estima-se que o HHV-6 possui mais de 100 genes que codificam proteínas (Yamanishi, 2000). A transcrição de genes é semelhante ao padrão das herpes viroses, com proteínas expressas imediatamente precoces (IE), precoces (E) e tardias (L) (Mirandola et al., 1998; Dockrell et al, 2003).

O gene U39 está envolvido na replicação do vírus e os genes U39 e U48 contribuem para fusão vírus-célula, através da síntese das glicoproteínas de superfície gB e gH. A gB do HHV-6 tem 39% de similaridade com a gB do HCMV, sugerindo uma reatividade imunológica cruzada entre a gB do HHV6 e a gB do HCMV (Dockrell et al., 2003).

O HHV-6 é composto por uma fita de DNA linear com aproximadamente 160 kb, envolvido por capsídeo icosaédrico constituído por 162 capsômeros e envelopado. A partícula viral envelopada mede cerca de 180 a 200nm de diâmetro (Santos et al., 2000). Tem se mostrado em sequenciamentos de nucleotídeos 66% de homologia entre a sequência do DNA do HHV-6 e HCMV (Singh e Carrigan, 1996). É um vírus linfotrópico, utiliza receptor celular CD46 e pode infectar outras células, como os monócitos, células endoteliais, epiteliais, células da glia e fibroblastos (Harma et al., 2003; Desachy et al., 2001).

O ciclo completo da replicação do HHV-6 ocorre em torno de 5 dias, quando o vírus pode ser detectado no interior de vacúolos citoplasmáticos e extracelularmente. Nos 3 primeiros dias de infecção, o capsídeo e o DNA viral podem ser observados no interior do núcleo. O envelope ocorre por brotamento de vacúolos citoplasmáticos, posteriormente fundem-se à membrana citoplasmática liberando partículas maduras.

O HHV-6 pertence ao gênero *Roseolo vírus* e possui o genoma colinear ao herpes vírus humano tipo 7 (HHV-7), a homologia é de 46.6% a 84,9%.

### 1.3.3- Herpes vírus Humano Tipo 7 (HHV-7)

O HHV-7 não foi classificado até agora, embora suas propriedades biológicas pareçam ser similares à classificação do HHV-6, que é do gênero *Roseolo virus*, da Subfamília beta herpes vírus (Dewhurst *et al.* 1997).

O HHV-7 é um vírus linfotrópico, tem tropismo por células T CD4+ e linhagem celular SupT1 (célula T linfoblastóide de linhagem contínua). Não infecta monócitos e o receptor CD4 é necessário, mas não o suficiente para a entrada do vírus na célula. O epitopo CD4 está presente em células glandulares, o que explica o isolamento deste vírus em saliva de humanos ao incorporar seu DNA nestas células, permanecendo latente (Miyaki *et al.*, 2006).

Estudos do HHV-7 tem sido bastante utilizado a transferência dos vírus que são isolados a partir das células de cordão umbilical para linhagem celular contínua T linfoblastóide - SupT1, devido ao fato de ser mais confiável trabalhar com células de linhagem contínuas do que manter sempre disponíveis células de cordão umbilical viáveis e livres de contaminação (Ablashi *et al.*, 1998).

Embora, seja mais confortável trabalhar com culturas celulares de linhagem contínua, os antígenos de HHV-7 aparecem, em cultivo celular, entre 4 e 7 dias após células de sangue de cordão terem sido infectadas, já as células

SupT1 demoram de 7 a 14 dias para demonstrarem antígenos sugerindo maior susceptibilidade das células de sangue de cordão a infecção por este vírus do que as células SupT1. Outras linhagens celulares T linfoblastóides que se mostram eficientes para o isolamento do HHV-6 (linhagens HSB2, MolT-3, J-Jhan, MolT-4 Jurkat) não são susceptíveis a infecção pelo HHV-7, pelo menos, não o suficiente para serem úteis para o cultivo (Ablashi et al., 1998).

O grau de infectividade e demonstração de antígenos é similar (45-60% de células infectadas) nos dois tipos de células - Células de sangue de cordão e SupT1 (Ablashi et al., 1998).

#### **1.4- Mecanismo de replicação do HCMV, HHV-6 E HHV-7**

Os herpes vírus têm a capacidade de infectar diferentes tipos celulares, apresentando tropismo por determinados tecidos. Após infecção primária os herpes vírus induzem a latência em seus hospedeiros naturais por toda a vida e o mecanismo da infecção latente ainda não foi totalmente elucidado (Bresnahan & Shenk, 2000). Sabe-se que para alguns herpes vírus, a latência ocorre em tipos específicos de células que permitem a entrada do vírus, mas bloqueiam sua replicação. Análises de determinados genes que permanecem ativos sugerem que eles atuam como reguladores, e podem manter o vírus em estado de latência ou ativo para a recorrência (Silva, 2000; Bresnahan & Shenk, 2000; Miller et al., 2005).

A estabilidade da latência e os fatores que irão reativar os vírus são diferentes para cada um, embora todos sejam reativados por drogas imunossupressoras, entretanto, estudos em humanos apontam para o provável sítio de latência, subpopulações de linfócitos, onde ocorreria a expressão de um número mínimo de genes (Lautenschlager et al., 2002).

A associação celular significa que o vírus é transmitido entre indivíduos e dissemina-se célula a célula; a imunidade celular é essencial para a defesa do hospedeiro contra esses vírus.

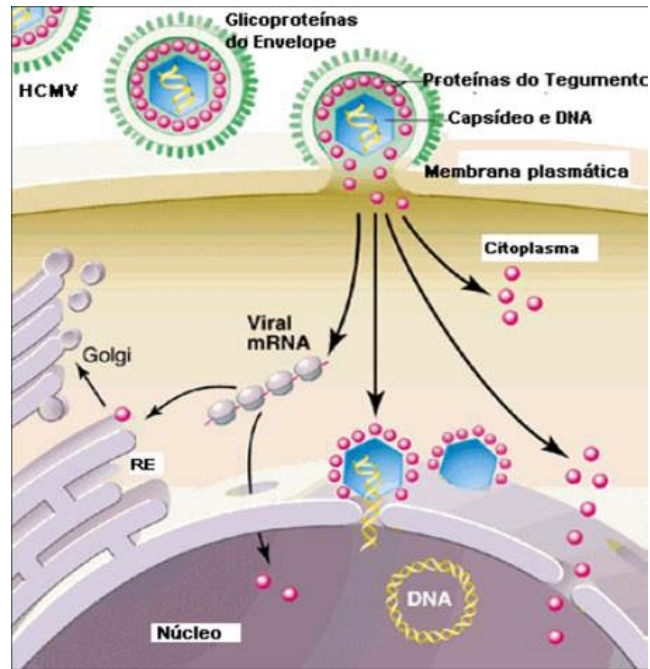
#### 1.4.1- Citomegalovírus Humano HCMV

A Figura 2 ilustra o mecanismo de replicação do HCMV, que ocorre em três etapas distintas é similar ao dos demais herpes vírus. A fase precoce na qual ocorre adesão do vírus à membrana celular do hospedeiro, com perda do envelope e penetração no interior da célula, na fase intermediária há expressão gênica e replicação do genoma; e na fase tardia, ocorre a montagem e liberação das novas partículas virais (Santos e Lazetti, 2000).

Na primeira fase chamada precoce, tem início com a entrada do vírus na célula hospedeira e incorporação do material genético. As proteínas da superfície do virion aderem aos receptores protéicos específicos na superfície celular através de ligações fracas, não-covalentes. As partículas virais penetram por um processo de endocitose dentro de vesículas pinocíticas, nas quais o processo de perda do envelope é iniciado, favorecido por um pH baixo. A ruptura das vesículas ou a fusão da camada externa do vírus com a membrana da vesícula deposita o core do vírus no citoplasma da célula (Levinson, 2000).

Na segunda fase, denominada de Intermediária tem duração de 24 horas, caracteriza-se pela transcrição e a replicação de grande parte do DNA viral. O primeiro passo da expressão gênica viral é a síntese do RNA mensageiro (RNAm), que é obtido a partir da RNA polimerase do hospedeiro no interior do núcleo (Bresnahan & Shenk, 2000). Uma vez sintetizado, é traduzido pelos ribossomas do hospedeiro em proteínas virais precoces e tardias.

A distinção entre ambas dá-se pela relação entre o seu surgimento e o processo de replicação do genoma viral. As proteínas precoces são enzimas necessárias à replicação do genoma viral, enquanto as tardias são proteínas estruturais dos vírus recém-formados (Bresnahan & Shenk, 2000)



(<http://utsouthwestern.edu/bresnahan.com>)

**Figura 2-** Ciclo de Replicação

Dentre as proteínas precoces, a mais importante é a polimerase, denominada replicase, que replica o genoma viral, (Levinson, 2000). O processo de replicação do genoma viral segue o princípio da complementaridade e, no caso do HCMV, por se tratar de um vírus composto por DNA de dupla fita, esse processo também é semiconservativo.

Na terceira fase, sendo a tardia, partículas virais recém-formadas são agrupadas dentro do capsídeo e inicia-se o processo de brotamento, durante o qual o nucleocapsídeo adere aos sítios específicos da membrana, interagindo com a matriz protéica. Nesse ponto, sofre um processo de evaginação e uma partícula envelopada brota da superfície da membrana (Levinson, 2000).

Durante a infecção natural, a replicação de HCMV pode ocorrer em células epiteliais, endoteliais, musculares, mesenquimais, hepatócitos, granulócitos e macrófagos, desse modo conclui-se que os fatores celulares que

determinam as consequências causadas por infecção de HCMV, este beta herpes vírus compartilha com outros herpes vírus a capacidade de permanecer em estado latente no hospedeiro, disseminar-se célula a célula, reativando em condições especiais e induzindo imunossupressão transitória ao receptor (Drago et al., 2000; Miller et al, 2005; Crumpakter et al, 2005).

Estudos *in vivo* com células de pacientes imunocomprometidos mostram que os leucócitos polimorfonucleares são as células sanguíneas mais frequentemente infectadas pelo HCMV e representam importante sítio de replicação (Drago et al., 2000).

Para iniciar a infecção, é necessário que o vírus seja adsorvido aos receptores de superfície celular, resultado de uma cascata de interações entre proteínas. Após esse processo ocorre a fusão do envelope viral com a lamela externa da membrana citoplasmática. A partir disto o capsídeo é transportado para os poros nucleares e o DNA sendo liberado ao núcleo da célula, ocorrendo assim a transcrição, replicação viral e a produção de novos capsídeos (Landolfo et al., 2003).

#### 1.4.2- Herpes vírus humano Tipo 6 (HHV-6)

O HHV-6 apresenta tropismo por células linfóides, indução de receptor CD4 em algumas células, supressão da resposta imune, indução de citocinas, transativação de outros vírus, capacidade de transformar certas células em cultura e em alguns casos a capacidade de aumentar a replicação do HIV (Viana et al., 2002; Abdel e Asmar, 2004; Lusso P, 2006).

Os monócitos, macrófagos e megacariócitos são suscetíveis á infecção por HHV-6, contudo os linfócitos T representam uma população de células em que este vírus se replica com maior eficiência, mas pode infectar outras linhagens de células de origem epitelial, fibroblástica e neural (Taniguchi et al., 2000, Lusso P, 2006).



O HHV-6 estabelece latência após infecção primária em diferentes células e órgãos (Taniguchi et al., 2000; Abdel e Asmar, 2004; Lusso P, 2006).

Na infecção natural por HHV-6 podem ser identificados três estágios:

- 1º) primário agudo na infância;
- 2º) ocorre em crianças e adultos saudáveis, onde o vírus replica em glândulas salivares e é secretado na saliva (variante B), não induz patologias evidentes, permanece latente ao menos em linfócitos e monócitos, e persiste em vários tecidos, possibilitando um alto nível de replicação;
- 3º) Ocorre com menos frequência, tipicamente em indivíduos imunocomprometidos e está ligado à reativação do vírus ou à reinfeção. Alguns estudos têm relacionado o HHV-6 a patologias como, esclerose múltipla, tumores, síndrome da fadiga crônica (Santos, 2000).

Em pacientes submetidos ao transplante, é comum o aparecimento da infecção ativa por HHV-6 (Humar et al., 2000) e geralmente ela aparece antes da infecção por HCMV (Lautenschlager et al., 2002; Lautenschlager et al., 2006; Sampaio et al., 2011). O período da detecção pelo HHV-6 é em torno de 20 dias após o transplante e para o HCMV de 25 a 35 dias (Abdel e Asmar, 2004)

A co-infecção pelo HCMV e HHV-6 está associada à manifestações clínicas e a disfunção do enxerto. Alguns estudos demonstram que a infecção pelo HHV-6 altera o sistema imune do hospedeiro podendo favorecer a reativação do HCMV (Abdel e Asmar, 2004; Lautenschlager et al., 2006).

#### 1.4.3- Herpes vírus humano Tipo 7 (HHV-7)

Como outros beta herpes vírus HHV-7 permanece latente em seus hospedeiros e podem-se reativar durante o estado de imunossupressão após transplante de órgãos (Ihira et al., 2001). Foi identificado a ativação de linfócitos

T CD4<sup>+</sup> em indivíduos saudáveis, nestes as glândulas salivares constituem o local preferencial e, as secreções orais, os melhores veículos de transporte, para a transmissão do vírus.

O HHV-7 assim como o vírus HIV ambos tem a molécula CD4<sup>+</sup> como um componente essencial para funcionar como receptor (Tomasini et al., 2011). Deste modo, o HHV-7, ao entrar no sistema imunitário de um determinado indivíduo, infecta os linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e a linha de linfócitos T imaturos, com uma eficiência variável, dependendo da imunocompetência do indivíduo infectado (Secchiero et al., 1998, Dewhurst et al., 1997).

### **1.5- Transmissão e epidemiologia do HCMV, HHV-6 E HHV-7**

Acredita-se que o HCMV infecta somente a população humana e sua transmissão ocorre via transmissão horizontal e vertical, tais como; contato com secreções orofaríngeas, lágrimas e vaginais, líquido seminal, leite materno, urina, fezes e sanguínea, uma vez infectado o indivíduo não mais elimina o vírus e este permanecendo em estado de latência, podendo ser reativado em condições especiais (Bresnahan & Shenk, 2000; Gupteat et al., 2003) assim como acontece nos pacientes imunossuprimidos.

As pesquisas correlacionando a idade e as prevalências da infecção pelo HCMV sugerem dois períodos de maior incidência da infecção; o período perinatal, via canal do parto, leite materno, banco de leite e contato com crianças contaminadas e o período de maturidade sexual, em contatos homossexuais ou heterossexuais (Drew, 1988).

Um dos mais intrigantes aspectos biológicos do HCMV é a distribuição altamente eficiente do vírus em toda a população. Diversos estudos sobre soropidemiologia demonstram que a infecção por HCMV ocorre em muitas regiões do mundo. Com a idade é comum o aumento da prevalência dos anticorpos e isto não depende da área geográfica, mas sim do nível

sócio-econômico das comunidades estudadas (Pannuti et al.,1987; Costa 1999; Aquino e Figueiredo, 2001).

A soroprevalência de HCMV em populações de alto nível sócio econômico varia de 40% a 60%, enquanto que em populações de nível sócio econômico mais baixo a soroprevalência é maior, variando de 80% a 100%. No Brasil a soroprevalência é alta, em média 90% em populações adultas (Aquino e Figueiredo, 2001).

Este vírus tem sido causa de grande morbidade e mortalidade em imunocomprometidos (Von Muller et al., 2006) como é o caso daqueles pacientes com deficiência imunológica, os transplantados de órgãos, portadores da Imunodeficiência Adquirida, crianças desnutridas ou com infecções congênitas, e pacientes com câncer submetidos a quimioterapia, o quadro clínico pode ser grave e muitas vezes conduzir à morte (Maya e Azulay, 2000; Hoppe et al., 2004; Hernando et al., 2005; Szczepura et al., 2006; Kochs et al. 2006).

Estudos demonstram que o HCMV acomete com frequência os transplantados de órgãos (Razonable et al., 2002, Sampaio et al., 2011; Costa et al., 2011; Milan et al., 2011) afetando dois terços desses pacientes, independente do órgão transplantado (Sebeková et al., 2005).

O risco da infecção pode estar relacionado com o estado sorológico tanto do doador quanto ao receptor, certas drogas como a ciclosporina, azitioprina têm sido implicadas como as facilitadoras de infecção causada pelo HCMV, podendo levar a replicação viral descontrolada (Maya e Azulay, 2000).

Em 1998, Falagas et al. constataram num grupo estudado de pacientes transplantados de fígado de que a infecção pelo HCMV é um fator preditivo independente para reduzir a sobrevida. Nessa população, a mortalidade foi maior nos primeiros seis meses, período em que o impacto da infecção é mais evidente.

O HHV-6 é também muito comum na população humana a soroprevalência também é alta, em crianças pode variar de 45% a 63%, e em adultos de 52% a 97%. No Brasil a soroprevalência está em torno de 78% e

esta taxa tem sido prevalente principalmente no nordeste do País (Freitas e Linhares, 1997).

A infecção pelo HHV-6 ocorre, quase sempre antes de 2 anos de idade, seguida por persistência viral com eliminação através da saliva (Razonable, 2009). A transmissão da infecção pelo vírus pode ser horizontal ou vertical (Silva, 2000). A primo-infecção provavelmente ocorre através de contato com saliva, transfusões sanguíneas e através de órgãos transplantados, a segunda forma de transmissão ocorre provavelmente através da placenta (Taya et al. 2004) e leite materno (Freitas et al., 2004).

A prevalência da infecção primária pelo HHV-7 na população em geral é alta, cerca de 5 infectados para cada 7 crianças (71%) segundo relatos de Tanaka et al. 1994. No Brasil (região norte), 93 % de adultos e crianças maiores que 10 anos de idade apresentam anticorpos de classe IgG contra o HHV-7, segundo estudos de (Tanaka et al., 1994; Freitas et al., 2004).

A primo-infecção pelo HHV-7 incide um pouco mais tarde que para o HHV-6. (Yoshikawa et al., 1989, Tanaka et al., 1996, Ward et al., 2001). A infecção pelo HHV-7 pode ocorrer mais cedo em regiões tropicais como o Brasil (Oliveira et al., 2003). A transmissão horizontal do HHV-7 se dá, provavelmente, através da saliva como foi sugerido por Takahashi et al., 1997. O índice de isolamento do HHV-7 a partir da saliva é cerca de 75% (Canada Communicable Disease Report, 2000). A transmissão após o parto através do leite materno é outra possível transmissão nosocomial/iatrogênica pode ocorrer através de transfusão de sangue, células progenitoras hematopoéticas e órgãos transplantados, causando infecção primária ou infecção recorrente (Ward, 2005).

Trabalhos recentes demonstraram que 0,2% em cromossomos de pacientes japoneses e 1,6% de células de cordão umbilical possuem DNA do HHV-6 incorporado ao seu genoma (Daibata et al., 1999; Tanaka-Taya et al., 2004) e isto pode acontecer também com HHV-7.

O HCMV, HHV-6 e HHV-7 possuem semelhantes vias de transmissão e por isso, encontram-se em elevada prevalência na população em geral e de vários países, incluindo o Brasil.

## **1.6- Manifestações clínicas de HCMV, HHV-6 E HHV-7**

### **1.6.1- Manifestação clínica de HCMV**

Os vírus do grupo herpes estabelecem infecções primárias com ou sem sintomas, dependendo do momento da vida em que ocorre. A transmissão do HCMV nos três primeiros meses da gestação pode desencadear no feto o surgimento de anormalidades congênitas (Ferreira et al., 2002).

No imunocompetente o quadro clínico de HCMV pode transcorrer de forma assintomática ou caracterizar-se quando as manifestações clínicas se fazem presentes, o quadro assemelha-se à “Síndrome da Mononucleose”, apresentada por estado febril persistente, mialgias, faringite, linfadenomegalia, sudorese e hepatoesplenomegalia (Costa 1999; Panutti et al., 2001).

Após a infecção primária, o HCMV persiste de forma indefinida nos tecidos do hospedeiro na fase de latência. Quando a resposta das células T do hospedeiro torna-se comprometida por imunodepressão, o vírus latente pode ser reativado e provocar inúmeras doenças como é o caso dos imunossuprimidos, o HCMV pode causar doença grave. Os grupos de maior risco são crianças com infecção congênita, receptores de transplante de órgãos, pacientes com câncer submetidos à quimioterapia e os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Costa, 1999; Maya e Azulay, 2000; Razonable et al., 2005; Linhares et al., 2011)

Dentre as complicações infecciosas ocasionadas pelo HCMV nos transplantados é bem comum o aumento da mortalidade a longo-prazo e à piora da sobrevida do enxerto (Sampathkumar et al., 2000; Angelis et al., 2003,

Linhares et al., 2011). Clinicamente a doença causada pelo HCMV se expressa por febre, mal estar, mialgia, leucopenia (contagem de leucócitos inferior a 4.0000/mm<sup>3</sup>), aumento das transaminases (hepatite), comprometimento pulmonar (pneumonite) e/ou gastrointestinal (colite, gastrite, esofagite) e a febre sendo a manifestação mais frequente, pode ocorrer também alterações neurológicas com sintomatologias compatível às encefalites são mais raras (Ljungman et al., 2002; Razonable et al., 2005; Humar et al., 2007).

A doença clínica causada por HCMV ocorre por três padrões epidemiológicos:

- 1) infecção primária, quando ocorre em pacientes previamente soronegativos;
- 2) infecção secundária, quando ocorre a reativação da infecção latente ou por superinfecção;
- 3) infecção terciária por reinfecção por outras linhagens do vírus (Maya e Azulay, 2000).

A fonte de infecção, tanto para a infecção primária, quanto para a superinfecção, está relacionada ao enxerto e às transfusões sanguíneas. Na reativação, o uso de medicações imunossupressoras para a manutenção do enxerto é a principal causa de reativação da infecção em pacientes com sorologia positiva para o HCMV (Van Der Meer et al., 1996).

A sintomatologia é diferente nestas três formas de apresentação da infecção, cerca de dois terços dos pacientes com infecção primária são sintomáticos, menos de 20% na reativação viral tem sintomas e cerca de 40% dos reinfecados têm sintomatologia atribuível ao HCMV (Costa, 1999). Quando ocorre a infecção primária após o transplante o impacto clínico é bastante relevante, refletindo uma piora no prognóstico do paciente (Singh, 2004).

Um dos fatores mais importantes é o status sorológico no período pré-transplante do doador e do receptor, já que a alocação de enxerto com sorologia positiva para receptor negativo pode resultar em infecção primária pós-transplante (Freeman et al., 2004).

É fundamental considerar também o papel de imunodepressão iatrogênica no desenvolvimento da infecção, drogas como a azatioprina, ciclosporina, dentre outras, tem sido implicadas como facilitadoras da doença pelo HCMV, podendo levar a replicação descontrolada de HCMV (Maya et al., 2000).

Para a caracterização de doença clínica por HCMV, além das evidências laboratoriais, faz-se necessária a presença de manifestações clínicas compatíveis com aquelas sabidamente causadas por esse vírus (Mustafa, 1994; Kotton et al., 2010).

A infecção citomegálica constitui a maior causa de morbidade e mortalidade durante as primeiras 14 semanas pós-transplante, aumentando custos de permanência do paciente no hospital, uma vez que favorece à superinfecção por patógenos oportunistas e aumenta riscos de rejeição do enxerto (Paya et al., 2002)

Nos transplantados hepáticos, a infecção pelo HCMV constitui a rejeição do implante. Nos pacientes com infecção ativa, cerca de 80% desenvolverão manifestações clínicas da doença e essa taxa pode ser maior quando o receptor é soronegativo e o doador soropositivo (Costa et al., 2000)

Além das manifestações próprias da doença, este vírus parece ser um imunomodulador, e a infecção por HCMV foi considerada um fator de risco independente para o desenvolvimento de superinfecções com patógenos oportunistas, além da incidência no processo de rejeição do enxerto. (Maya et al., 2000).

As evidências de replicação viral e sintomas clínicos em transplantados ocorrem principalmente no decorrer do 1º ao 4º mês pós-transplante e são manifestações clínicas mais comuns a pneumonia intersticial, esofagite, gastrite, colite, retinite, febre, demora na pega do enxerto nos casos de transplantes de medula óssea, e nos transplantes de órgãos sólidos como (rim, fígado, e coração) pode ocorrer a rejeição (Razonable et al., 2005; Arthurs et al., 2007).

A apresentação clínica depende do órgão transplantado, do tipo e intensidade da imunossupressão (Rowshani et al., 2005). No transplante de fígado, na infecção primária tendem a ser mais importantes, pois o HCMV pode estar limitado à viremia, quando é detectada a replicação do vírus em sangue periférico ou o aumento significativo de anticorpos específicos sem sintomas ou ainda apresentar como síndrome viral com febre maior ou igual a 38°C, mal estar, leucopenia, linfocitose atípica igual ou superior a 3-5% e plaquetopenia (Seehofer et al., 2002; Angelis et al., 2003; Freeman et al., 2004; Rowshani et al., 2005).

O tratamento antiviral atualmente disponível controla a manifestação aguda da doença na maioria dos casos, entretanto não erradica o HCMV e, portanto, a doença pode recorrer após o adequado controle da infecção inicial em até um terço dos casos, com taxas de recorrências relatadas em alguns estudos de 26-31% dos casos (Sampathkumar et al., 2000; Rowshani et al., 2005).

#### 1.6.2- Manifestações Clínicas de HHV-6

A infecção primária pelo HHV-6 ocorre principalmente na infância no primeiro ano de vida, alguns estudos indicam que, após os 12 meses de vida, mais de 90% das crianças imunocompetentes já foram infectadas com o HHV-6. A maioria das infecções não apresentam sintomas, mas 20% das crianças apresentam febre, associada a erupções cutânea (*Roseola infantum* ou exantema súbito), abscessos e outras manifestações clínicas (Braun et al., 1997; Boutolleau et al., 2003).

Após a infecção primária, o vírus replica nas glândulas salivares e está presente na saliva. Ele permanece latente nos monócitos/macrófagos do hospedeiro por toda vida nos, persistindo em uma variedade de tecidos como pele, pulmão e cérebro. Pode reativar durante imunossupressão, principalmente 3 meses após transplante de órgão, e está associado a infecções oportunistas, doença citomegálica e possíveis episódios de rejeição aguda (Deborka et al., 2003; Jacobs et al. 2003; Ward et al., 2006).



Vários estudos demonstram que a infecção pós-transplante por HHV-6 tem sido implicada como causa de hepatite, pneumonite, encefalite e síndromes virais febris (Mendez et al., 2001; Razonable e Paya, 2002).

Os pacientes imunossuprimidos manifestam efeitos diretos e indiretos decorrentes da infecção viral, por HHV-6. São efeitos diretos, febre com erupções cutâneas, mielossupressão, pneumonite intersticial e quadros de encefalites. Os efeitos indiretos resultam em exacerbação da infecção e doença causada por HCMV, com aumento da frequência de infecções por agentes oportunistas (Razonable e Paya, 2002).

Foram observadas evidências sorológicas de reativação simultânea de HCMV e HHV-6 após o transplante (Ratnamohan et al., 1998). Em pacientes transplantados hepáticos com soroconversão para HHV-6, foi identificado um significativo fator de risco para o desenvolvimento dos sintomas da doença por HCMV.

Estudos relatam a associação da infecção de HHV-6 a febres inexplicadas com profunda trombocitopenia após transplante de fígado e leucopenia severa após transplante de rim, e pneumonites intersticiais nos receptores de medula óssea (Gentile, 2000).

O HHV-6 é uma causa importante para supressão idiopática da medula após transplante, e foi isolado em cultura de sangue de 38% dos receptores adultos. O HHV-6 também tem sido relacionado à episódios de encefalites (MCCullers, 1996).

Nos últimos anos vários estudos têm demonstrado a frequência da infecção por HHV-6 em episódios clínicos após o enxerto (Lee et al., 2011; Biganzolli et al., 2010; Harma et al., 2006; Lautenschlager et al., 2002; Lautenschlager et al., 2006; Sampaio, 2011), contudo, ainda não são suficientes para estabelecer uma causa que liga este vírus a doença. Até o presente momento é possível concluir que HHV-6 é um patógeno oportunista e

possivelmente ser a causa potencial para a doença em transplantados de órgãos (Gentile, 2000).

Uma potencial interação entre HHV-6 e HCMV tem sido reportada, e a co-infecção pode ter severas manifestações clínicas. Convulsões, encefalite e encefalopatia têm sido associadas a doenças febris causadas pelo HHV-7 e HHV-6 bem antes do exantema súbito ser, clinicamente, caracterizado no paciente. O HHV-6 também pode predispor o receptor de transplante para infecções oportunistas juntamente com o HCMV ou outras infecções similares (Dockrell et al., 1999).

Existem relatos sugerindo ligação do HHV-6 com Esclerose Múltipla e Síndrome de Fadiga Crônica, mas ainda há muita controversa (Tyler, 2003). Devido à estreita relação entre o HHV-6 e HHV-7, pode se pensar que estas características também se apliquem ao HHV-7.

### 1.6.3- Manifestações clínicas de HHV-7

Como os outros herpes vírus, o HHV-7 pode estabelecer uma infecção latente por toda a vida do indivíduo e se reativar durante um estado de imunossupressão (Lautenschlager et al., 2002; Sampaio et al., 2011; Thomasini et al., 2007).

A infecção primária por HHV-7 caracteriza-se por Exantema Súbito ou Roséola, muito comum em crianças (Tong et al., 2000). A doença se apresenta com um quadro de febre alta que dura poucos dias, e erupções cutâneas em média de 24 á 48 horas (Lautenschlager et al., 2002). Os fatores que controlam a reativação do HHV-7 não estão estabelecidos, mas parece estar associados ao grau de imunossupressão (Razonable e Paya, 2002).

Em indivíduos imunossuprimidos que receberam transplante de órgãos a reativação pode ocorrer em cerca de 14 a 46%, e esta, pode ser similar ao que ocorre com outros herpes vírus (Yoshikawa, 2003).

Essa variação é devido à condição clínica do paciente, tipo de imunossupressão e o método de detecção viral utilizado (Yoshikawa et al., 2003; Razonable et al., 2002). Os fatores que controlam a reativação de HHV-7, em pacientes imunossuprimidos, farmacologicamente, não são ainda muito claros, mas parece estar associada ao grau de imunossupressão.

Sugere-se que os fatores que controlam a reativação ou aumento da replicação do HHV-7 em indivíduos imunossuprimidos podem ser similares ao previamente identificado para o HCMV (Mendez et al., 2000).

A reativação do HHV-7 tem sido também associada com febre e mielossupressão (Feldstein et al., 2003; Biganzolli et al., 2010, Thomasini et al., 2007). Doenças neurológicas como a encefalite, encefalopatia tem sido relacionadas a infecção por HHV-7, incluindo estado epilético (Ward et al., 2005).

Um fator que pode causar confusão na análise do HHV-7 quando é realizado através de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em sangue periférico, pois pode ser um potencial diagnóstico de infecção latente (Griffiths et al. 2000). Contudo, a detecção do DNA do HHV-7 em soro ou plasma está relacionada à replicação viral ativa (Ihira et al., 2011; Feldstein et al., 2003; Canada Communicable Disease Report, 2000).

### **1.7- Diagnóstico laboratorial**

O diagnóstico de infecção por HCMV, HHV-6 e HHV-7 pode ser feito através de sorologia, reação em cadeia da polimerase (PCR), R-Time, cultura viral e pesquisa de antigenemia.

O diagnóstico precoce da infecção de HCMV, HHV-6 e HHV-7 é importante uma vez que vários estudos demonstram que o tratamento precoce da infecção ativa assintomática reduz efetivamente quadros de morbidade, (Hoppe et al., 2004; Lautenschlager et al. 2002; Sampaio et al., 2011; Thomasini et al.,

2007), como também, é possível diferenciar a infecção de outras viroses oportunistas ou de rejeição, auxiliando o monitoramento de drogas antivirais e fornecendo uma ferramenta para estudo da interação entre vírus e o sistema imune (Silva, 2000)

O primeiro método de diagnóstico utilizado para identificar o HCMV foi a citologia exfoliativa, esta técnica evidenciava a presença de células grandes as quais apresentavam inclusões no interior do núcleo, sendo identificadas como inclusões citomegálicas. Posteriormente foram surgindo diversos métodos sensíveis e mais específicos para identificar a infecção causada por este herpes vírus. Estes métodos foram agrupados em 5 categorias: citológicos e histológicos, isolamento do vírus, sorológicos, identificação de antígenos virais e métodos moleculares. (Chou, 1999; Lautenschlager et al., 2000).

#### 1.7.1- Técnicas citopatológicas e histopatológica

##### 1.7.1.1- Técnicas citológicas

Estes métodos podem ser realizados em materiais aspirados de tecidos e secreções (Drew, 1988; Maya e Azulay, 2000). Baseiam-se na pesquisa de células com inclusões citoplasmáticas típicas; entretanto, por apresentarem baixa sensibilidade atualmente tem pouquíssimo uso na prática clínica. Foi o primeiro método utilizado para se detectar a infecção pelo HCMV em pacientes vivos, por meio da pesquisa de células esfoliadas no material examinado.

##### 1.7.1.2- Técnicas histológicas

É um método de detecção por visualização das inclusões típicas nos tecidos. O achado de células com inclusões típicas permitem muitas vezes correlacionar o HCMV a disfunção ou lesão do órgão estudado. Porém, este método apresenta baixa sensibilidade, mas apesar disto ele evidencia doença

tecidual invasiva (Maya e Azulay, 2000). As vantagens desta técnica são o baixo custo, simplicidade e disponibilidade da utilização do equipamento.

### 1.7.2- Isolamento viral

#### 1.7.2.1- Isolamento Viral HCMV

O HCMV pode ser isolado de materiais biológicos variados, como os fluidos biológicos (urina, saliva, sangue, secreções cervicais, leite materno, lágrimas, sêmen, fezes e lavados aspirados de órgãos) e tecidos obtidos de biópsias ou necropsias (Ho, 1991). Os materiais biológicos ao serem coletados devem ser processados imediatamente, por serem termolábeis, e no caso de transporte do material este deverá ser realizado em condições ideais de temperatura.

O diagnóstico clássico utilizado para demonstrar infecção ativa por HCMV é a inoculação do material suspeito em cultura de fibroblastos humanos, única linhagem celular que permite sua replicação *in vitro*. (Chou, 1990). O efeito citopático é observado após muitos ciclos de replicação e dependendo da concentração de vírus na amostra esta replicação se torna ainda mais lenta.

#### 1.7.2.2- Isolamento viral HHV-6

Como o HCMV, a cultura celular pode ser usada para isolar e identificar o HHV-6 com base na aparência dos efeitos citopáticos específicos (Singh e Carrigan, 1996). O HHV-6 pode ser isolado de linfócitos de crianças durante a febre e a fase pré-eruptiva do exantema súbito (ES) (Braun et al., 1997).

O isolamento do HHV-6 foi a técnica originalmente utilizada para identificação desse novo herpesvírus. O isolamento é realizado cultivando-se, em conjunto, células mononucleares (CMN) do sangue periférico do paciente com CMN obtidas do sangue do cordão umbilical de recém-nascidos.

Um rápido ensaio pode detectar infecção ativa do HHV-6 em 72 horas. Nesse ensaio, células mononucleares de sangue periférico são inoculadas em fibroblastos diplóides humanos por 48 horas, marcados com antissoro específico para o principal antígeno do HHV-6 (Singh e Carrigan, 1996).

#### 1.7.2.3- Isolamento viral HHV-7

O isolamento do HHV-7 pode ser feito em células mononucleares de sangue umbilical ativadas com fitohemaglutinina (agente que induz transformação blástica em células T) e com adição de interleucina-2 e popibrene, esta última, uma substância que facilita a infecção celular pelo HHV-7. A transferência das culturas para linhagem celular T linfoblastóide - Células SupT1 tem sido descrita (Ablashi et al., 1998).

Para que se possa fazer o isolamento do HHV-7 é necessário dispor de células mononucleares de cordão umbilical. Estas células precisam ser coletadas na sala de parto tão logo quanto possível. A coleta deve ser feita com seringa após o cordão ter sido cortado e o sangue é introduzido em tubos estéreis contendo heparina. Posteriormente os tubos devem ser encaminhados para análises, e o processamento do material realizado de forma rápida para garantir a viabilidade celular.

As células mononucleares são isoladas com utilização de gradientes de densidade (Ficoll-Hypaque), lavadas em PBS e cultivadas a 37°C em meio de cultura RPMI-1640 contendo soro fetal bovino. A cultura do material é inoculada e incubada em estufa de CO<sup>2</sup> ou sistema fechado.

#### 1.7.3- Métodos Sorológicos

Os métodos sorológicos modernos detectam presença de anticorpos da classe IgM e IgG (Biganzoli et al., 2010) específicos no sangue ou aumento do título de IgG em 4 vezes ou mais ou pela soroconversão, porém em indivíduos

imunocomprometidos este diagnóstico tem valor limitado, pois, a resposta IgM pode estar ausente ou resultar de reação sorológica cruzada entre os beta herpes virus (HCMV, HHV-6 e HHV-7).

A detecção dos anticorpos pode ser feita por imunofluorescência indireta (IFI), ensaio de imunofluorescência anticomplemento (EIAC) ou ensaio imunoenzimático (Elisa), sendo este o método mais sensível.

As principais razões para o uso clínico dos testes sorológicos para HCMV são a determinação da susceptibilidade à infecção primária (infecção sintomática no receptor) e a avaliação do sangue e do órgão do doador quanto à prévia exposição ao HCMV (potencial transmissão de HCMV). Os métodos clássicos não discriminam anticorpos IgM e IgG e dentre estes há a neutralização viral e a fixação do complemento.

Quando ocorre infecção primária, os anticorpos de classe IgM são os primeiros a serem sintetizados, seguidos posteriormente, pelos de classe IgG. Estes últimos permanecem pelo resto da vida do indivíduo (memória imune). A detecção de anticorpos da classe IgG indica contato prévio ou antigo.

Pesquisa e quantificação de anticorpos das classes IgM e IgG anti-HHV-7 tem sido muito utilizadas por pesquisadores para determinar a soroprevalência desse vírus na população em geral. No entanto, a utilidade da sorologia para monitorização de pacientes imunossuprimidos ainda não está bem definida. A reação cruzada entre HHV-7 e o HHV-6 é um fator preocupante, porque a maioria dos soros humanos tem anticorpos para os dois vírus (Ablashi et al., 1998).

#### 1.7.3.1- Imunoensaio enzimático por Elisa

Esta técnica baseia-se na utilização de antígenos ou anticorpos marcados com enzimas e permitem a detecção, titulação e quantificação de substâncias de interesse biológico. O teste detecta quantidades extremamente

pequenas de antígenos e anticorpos, sendo bastante preciso se os reagentes estiverem bem padronizados (Chantlyne et al., 1999). Esta técnica tem a desvantagem de não permitir a detecção do vírus nas fases iniciais da infecção, uma vez que os anticorpos só são produzidos pelo hospedeiro após esta fase.

Neste ensaio a reação antígeno-anticorpo é monitorada por medida da atividade enzimática. Este teste foi desenvolvido como uma alternativa ao radioimunoensaio, o qual utiliza isótopos radioativos, para a detecção de antígenos e anticorpos.

No teste de Elisa indireto, amplamente empregado para pesquisa de anticorpos, antígenos purificados são imobilizados numa placa de plástico, onde o soro a ser testado deverá ser adicionado. Se na amostra existirem anticorpos contra o antígeno imobilizado, ocorrerá a ligação entre os dois imunorreagentes.

A seguir, o sistema é lavado, para remoção dos anticorpos não ligados. Na etapa seguinte, adiciona-se um conjugado à placa (anti-imunoglobulina humana, marcada com uma enzima). Finalmente, acrescenta-se um substrato que sofre a ação da enzima, gerando um produto colorido, detectado visualmente ou por fotometria. A técnica permite detectar quantitativamente diferentes classes de imunoglobulinas, possuindo boa sensibilidade e especificidade.

#### 1.7.3.2- Imunofluorescência (IF)

Um método que permite uma detecção precoce da presença do vírus é a imunofluorescência, que é um teste enzimático de detecção dos antígenos específicos dos vírus. Este método baseia na pesquisa de anticorpos em espécimes clínicos, é um processo onde tem a capacidade das moléculas de anticorpos se ligarem a fluorocromos sem perder sua reatividade específica com o antígeno.



Os fluorocromos mais utilizados são rodamina B e isotiocianato de fluoresceína, que absorvem e emitem luz na faixa do visível. Os testes de imunofluorescência podem ser classificados em diretos ou indiretos. É um teste que apresenta elevada sensibilidade, além de detectar diferentes classes de imunoglobulina. Os testes de imunofluorescência podem ser classificados em diretos ou indiretos. O ensaio de imunofluorescência direta (IFD) é empregado na pesquisa e localização do antígeno em células ou tecidos, através de um anticorpo específico marcado com fluorocromos (conjugado). Ocorre a fixação do conjugado ao antígeno formando um complexo estável. O anticorpo não ligado é removido por processos de lavagens e o preparado é observado em microscópio de imunofluorescência.

Este ensaio requer o preparo de um conjugado específico para cada sistema que se queira estudar. O ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) apresenta várias vantagens, pois é sensível, específico, reprodutível, de padronização e execução simples. O mesmo conjugado pode ser utilizado em sistemas diferentes e podem-se determinar as classes e subclasses de anticorpos utilizando-se conjugados específicos. A necessidade de microscópio de imunofluorescência, a subjetividade na leitura e não automação representam limitações do teste (Roitt et al., 1999)

A imunofluorescência indireta (IFI) tem sido empregada com frequência no diagnóstico sorológico do HHV-7. Para confecção das lâminas, células de sangue do cordão umbilical ou células T1 infectadas com cepas de HHV-7 são depositadas no centro da lâmina de microscopia, secas e fixadas. As lâminas são recobertas com diluições adequadas da amostra do paciente (soro ou plasma) e incubadas em câmara úmida a 37°C por tempo indeterminado. Após, a incubação, elas são lavadas com tampão para retirar os anticorpos e outras proteínas que não se ligaram aos antígenos virais. Em seguida as lâminas devem ser recobertas com anticorpos anti-IgG ou anti-IgM específico marcados com fluoresceína, incubadas e lavadas novamente.

Na presença de anticorpos na amostra, eles se ligarão às proteínas virais presentes na superfície das células fixadas e os anticorpos marcados com fluoresceína se ligarão aos anticorpos específicos para revelar a reação. As lâminas são levadas ao microscópio de fluorescência onde se observam células com coloração fluorescente esverdeada quando positiva.

#### 1.7.3.3- Método de avidéz para detecção de anti HHV-7

No teste de avidéz, uma titulação de anticorpos IgG é realizada e repetida na amostra após o tratamento com solução tampão contendo uréia. Os anticorpos de classe IgG quando começam a serem sintetizados possuem baixa avidéz pelo antígeno produzindo ligações antígeno-anticorpo fracas e sensíveis á ação da uréia que é capaz de desfazer essas ligações. Os anticorpos que estão sendo sintetizados por mais tempo produzem ligações antígeno-anticorpo mais fortes, pouco ou nada sensíveis à ação da uréia.

#### 1.7.3.4- Método Western Blot para HHV-7

Neste método, proteínas do sobrenadante de cultivo celular do HHV-7 (centrifugado e filtrado) são separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (duodecil-sulfato de sódio) e transferidas para membranas de nitrocelulose. Este método de eletroforese separa as proteínas de acordo com seus pesos moleculares.

As fitas de nitrocelulose contendo as proteínas separadas são colocadas em contato com uma diluição de amostra (soro ou plasma) e, após incubação a imunoreatividade é revelada em bandas por anticorpos anti-IgG marcados com fosfatase alcalina.

O teste tem sido considerado imunologicamente específico para o HHV-7 (Black et al., 1996), sendo utilizado como útil para resolver problemas de reatividade sorológica cruzada.

#### 1.7.4- Detecção de antígenos virais (Antigenemia)

##### 1.7.4.1- Antigenemia para HCMV

A antigenemia para HCMV já está bem estabelecida na literatura, foi introduzido no Brasil em 1992 e utiliza método descrito por Van Der Bij em 1988.

Os herpes vírus quando utilizam as células para se replicarem induzem, obviamente, a produção de proteínas virais e estas, podem ser detectadas através da reação com anticorpos monoclonais (C10 e C11) que detectam o antígeno viral pp65, que é uma proteína estrutural expressa em leucócitos durante da fase precoce na replicação. São extremamente específicos, pois não são detectadas em reação cruzada de células infectadas com outros vírus pertencentes à família *Herpes virinae*, e também não reagem com outras células humanas (Boeckh et al., 1998; Lautenschlager et al., 2000).

Podem-se utilizar anticorpos contra várias proteínas do vírus, mas é essencial que se use anticorpos contra proteínas específicas (anticorpos monoclonais). A antigenemia é um marcador de viremia, ou replicação viral ativa, e nunca é detectada em casos de infecção latente, é uma técnica que se baseia na detecção de proteínas estruturais encontradas na região do tegumento através da coloração direta de polimorfonucleares (PMN) com anticorpo monoclonal contra a proteína pp65 expressa desde a fase precoce da replicação viral e detectada em grandes quantidades após 48 a 72 horas da replicação (The et al., 1992; Amorin et al., 2001; Schroeder et al., 2003; Bonon et al., 2005).

A antigenemia é um teste que tem alta sensibilidade de 95,2%-100% e especificidade de 55,3%-63,2%, com VPP de 30%-63,2% e VPN de 73%-100%. Sua eficácia é boa por ser uma técnica rápida, direta e sensível, sendo considerada uma técnica quantitativa para carga viral, com isto, permite correlacionar viremia com gravidade da doença clínica (Van Der Berg et al., 1991; The et al., 1992).

A antigenemia para HCMV é um dos testes que mais precocemente tem resultados positivos para detectar a infecção ativa (Panutti, 1991; Amorin et al., 2001; Bordelis et al., 2005; Bonon et al., 2005; Milan et al., 2011), e se torna positiva em média 9-18 dias antes do estabelecimento da doença, tem sido amplamente utilizado para a detecção precoce da infecção ativa em transplantados de órgãos. (Panutti, 1991, Bonon et al., 2005; Sampaio et al., 2011; Milan et al., 2011). O tempo de processamento é em torno de seis horas, não necessitando de equipamentos de alta tecnologia, mas requerendo a experiência do examinador no seu desenvolvimento e leitura das lâminas (Sampathkumar et al., 2000).

A vantagem adicional em relação aos demais métodos é o fato de seu resultado ser expresso de forma quantitativa, permitindo, além do diagnóstico, a monitorização da resposta ao tratamento clínico (Bonon et al., 2005, Linagui et al., 2004). A desvantagem da referida técnica é por se fazer necessário a rapidez no processamento do material coletado (Bonon et al., 2005), sendo recomendável de 6 à 8 horas, para que não ocorra diminuição de sensibilidade; nos pacientes com neutropenia, este exame não pode ser realizado, devido a contagem baixa dos granulócitos, sendo nesta situação necessário recorrer a testes moleculares os quais também tem como vantagem a possibilidade do material a ser investigado poder ser estocado em torno de 72 horas na temperatura ambiente sem ocorrer diminuição significativa dos níveis de DNA (Boeckh e Boivin 1998; Maya e Azulay, 2000).

#### 1.7.4.2- Antigenemia para HHV-6 e HHV-7

Um método de antigenemia para HHV-6 e HHV-7 foi descrito por (Launtenschager et al., 2002, Hårma et al., 2006). Um método por determinação imunocitoquímica e consiste na separação de células mononucleares de sangue periférico colhido com anticoagulante EDTA através de gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque) e citocentrifugação em lâminas de microscopia. As lâminas são

fixadas e recobertas com anticorpos monoclonais de camundongo contra os antígenos precoces e tardios do HHV-6 ou HHV-7 (Sampaio et al., 2011).

A reação de imunoperoxidase é realizada usando anticorpos de coelho contra os anticorpos monoclonais de camundongo acima descritos e, um terceiro anticorpo de cabra contra este último formando um “sandwiche”. Estes dois últimos anticorpos estão conjugados a peroxidase (horseradish). A reação é revelada pela adição de amino-etil-cabazol e peróxido de hidrogênio usando hematoxilina de Mayer como contra-corante.

As lâminas são observadas em microscópio óptico para verificação e contagem das células que exibirem reação positiva. As células positivas apresentam coloração amarela escura ou marrom em seu citoplasma. A reação positiva é encontrada, usualmente, em linfócitos (Launtenschager et al., 2002; Harma et al., 2006; Sampaio et al., 2011).

#### 1.7.5- Métodos moleculares

##### 1.7.5.1- Detecção de ácidos nucléicos

O desenvolvimento de técnicas de DNA recombinante com consequente clonagem e caracterização do HCMV tornou possível a detecção deste vírus em amostras biológicas. Estes métodos apresentam vantagens significativas sobre as técnicas clássicas, entre as quais destacam-se a precocidade no diagnóstico, sensibilidade e especificidade (Chou e Merigan, 1983). A desvantagem é a complexidade de realização, utilização de isótopos radioativos e necessidade de alta carga viral para a detecção e uma boa estrutura laboratorial (Chou e Merigan, 1983; Maya, 2000).

#### 1.7.5.2- Reação em cadeia da polimerase (N-PCR)

Com a introdução da amplificação de DNA por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) por Saiki et al., 1985, a detecção de agentes infecciosos tornou-se mais fácil e rápida, sobretudo, no diagnóstico de doenças causadas por vírus, que antes dependia do isolamento em cultura ou métodos sorológicos nem sempre conclusivos (Piiparinen et al., 2003).

O PCR qualitativo é freqüentemente o primeiro teste a detectar a infecção assintomática subclínica, mas pouco específico, o valor preditivo é baixo para a utilização de diagnóstico de doença por HCMV, por isto, é excluído como diagnóstico rotineiro de monitoramento para drogas antivirais (Amorin et al., 2001). É um método rápido (4-6 horas), específico e extremamente sensível, porém, devido a sua alta sensibilidade, os principais problemas são os falso-positivos resultantes da contaminação durante a execução do teste. Resultados falso-negativos também podem ocorrer devido à presença de inibidores na amostra (The et al., 1992, Piiparinen et al., 2004).

É uma técnica que ocorre variação de um laboratório para outro devido aos diversos componentes sanguíneos, “primers” e técnicas de amplificação (Rowshani, 2005). Por estes motivos, cuidados especiais devem ser tomados durante a manipulação das amostras e da reação.

O tipo de amostra e o método de extração de DNA destas amostras devem ser cuidadosamente escolhidos, pois extratos de DNA não bem preparados podem conter proteínas que inibem a PCR (Tomasini et al., 2007; Peigo et al., 2009). Os iniciadores escolhidos devem ser analisados quanto à sua especificidade porque estes devem amplificar somente o fragmento do genoma do organismo em questão e nada mais. Cuidados também devem ser tomados para que a região do genoma que será pesquisada seja, preferencialmente, uma região altamente conservada, que sofra muito pouca ou nenhuma mutação para que não haja reações falso-negativas.

Quando se trabalha com vírus que causam infecção latente, é preciso escolher muito bem o tipo de amostra para análise de acordo com o objetivo da análise (Peigo et al., 2009). Se a intenção é analisar o DNA do vírus incorporado ao genoma do hospedeiro, ou seja, determinar se há infecção latente, é preciso realizar a PCR usando DNA extraído de tipos celulares que são alvo do vírus.

No caso do HHV-6 e HHV-7, o tipo de célula é preferencialmente, linfocítica ou proveniente das glândulas salivares (saliva). Mas, se a intenção é avaliar infecção ativa, estes materiais não são adequados por conterem DNA viral incorporado ao DNA celular, resultando numa interpretação falso positiva (Griffiths et al., 1999).

O ajuste da concentração de DNA para 30ng (extraído de leucócitos de sangue periférico) pode ajudar a contornar o problema da detecção de infecção latente (Griffiths et al., 1999). No caso do HHV-6 e HHV-7, admite-se que DNA extraído de soro ou plasma como material adequado para detecção de infecção ativa, já que só haveria vírus circulantes detectáveis fora da célula nesta condição (Feldstein et al., 2003; Ihira et al., 2001). Contudo, vários autores têm sugerido que a PCR quantitativa é a mais adequada para determinação da infecção ativa (Yoshikawa et al., 2003; Mendez et al., 2001; Ward et al., 2005, Raisa et al., 2006).

#### 1.7.5.3- Nested PCR (Reação Dupla em Cadeia da Polimerase)

Na tentativa de se aumentar a sensibilidade e especificidade da PCR simples e de se obter resultados mais rápidos, tem sido utilizada a Nested-PCR (dupla PCR). Esta variação propiciou aumento da especificidade e sensibilidade da PCR. Nela o produto da primeira PCR, amplificado com um par de iniciadores, é submetido à nova reação de amplificação utilizando-se outro par de iniciadores internos ao primeiro, sendo o produto então detectado por eletroforese em gel de agarose (Abecassis et al., 1997).

A amplificação gênica é um método de biologia molecular que permite a produção de grande quantidade de fragmentos específicos de DNA, a partir de substratos complexos e em concentrações diminutas (Olive et al., 1989; Costa et al., 1992). Este procedimento consiste em repetidos ciclos de síntese de DNA por meio de dois iniciadores (“primers”), sendo segmentos de aproximadamente 20 nucleotídeos, com sequências complementares as duas extremidades do fragmento alvo, e levados por uma reação enzimática mediada por polimerase, com atividade em altas temperaturas (“taq DNA polimerase”).

Os “primers” flaqueiam a região alvo do DNA à ser duplicada, este produto é utilizado como um substrato para o outro, resultando em ciclos. Portanto o número de cópias do fragmento alvo tem um aumento exponencial, facultando, no final de 30 ciclos, um acréscimo na ordem de  $10^6$  cópias, valendo-se de uma única célula. Cada ciclo da reação de amplificação é constituído por três fases distintas: Desnaturação, onde ocorre a separação das hélices do DNA a ser amplificado; Anelamento, onde ocorre a ligação complementar entre os “primers” e o DNA a ser amplificado e Extensão que faz síntese do DNA pela Taq DNA polimerase (Saiki et al., 1985; Shibata et al., 1988).

Após alguns ciclos, as fitas de DNA que correspondem à sequência-alvo estarão presentes em maior quantidade do que as fitas de comprimento variável. Os fragmentos com comprimento variável correspondem a uma pequena fração de todas as cópias de DNA (Pozo e Tenório, 1999). Alguns estudos têm sugerido que a técnica de “Nested” PCR para diagnóstico da infecção pelo HCMV produz resultados compatíveis à cultura clássica, atingindo 100% de especificidade e 93% de sensibilidade, sendo uma metodologia mais rápida (Olive et al., 1989; Evans et al., 1997).

Em todos os trabalhos os resultados foram alcançados após hibridização do produto da amplificação simples, com sondas específicas marcadas com P3 (Maya e Azulay, 2000). Com base nos trabalhos pioneiros Shibata et al., 1988 a técnica de PCR foi introduzida na literatura para o



diagnóstico da infecção pelo HHV-5 em vários grupos de risco para esta doença. Diversos métodos de PCR são utilizados atualmente: PCR simples, “Nested” PCR (dupla PCR), RT-PCR (PCR após transcrição reversa), a técnica de PCR pode ser qualitativa ou quantitativa, entretanto sua padronização não está bem estabelecida, diferentes laboratórios amplificam diferentes regiões do genoma utilizando diferentes pares de “primers” (Gerna et al., 1996).

O aumento da especificidade e sensibilidade da PCR foram alcançados pela “Nested-PCR” (Brytting et al., 1991). Esta variação da PCR é uma técnica que amplifica uma sequência alvo em dois passos, na primeira, utiliza-se um par de “primers” específicos para um fragmento alvo desejado; uma alíquota da 1ª reação, é submetida à nova reação de amplificação utilizando um par de “primers” internos ao primeiro, por isso ocorre o aumento da sensibilidade e especificidade da reação. Este produto final é detectado em gel agarose (Britting et al., 1991; Ehrntst et al., 1996).

#### 1.7.5.4- PCR em tempo real (REAL-TIME PCR)

A metodologia de PCR em tempo real de amplificação (Real-Time PCR), de alta sensibilidade e precisão, tem sido utilizada para a detecção e monitoramento da carga viral. A sua sensibilidade e especificidade estão diretamente relacionadas à escolha dos “primers” e sondas, e a precisão é determinada pela Ct (“threshold cycle”), que é calculada durante a fase exponencial da reação (Bordils et al., 2005).

O método é baseado na detecção de ciclo após ciclo de produto de PCR acumulado, sendo possível pelas condições de ciclagem, detecção fluorescente e aplicação de um software específico em um único instrumento. Os resultados quantitativos são obtidos logo após o término da reação de amplificação (Bordils et al., 2005).

Os sistemas de detecção da seqüência mais usados incluem 2 tipos de reações SYBR® Green - o produto da PCR pode ser quantificado em tempo real pelo uso de um marcador (“dye”) que se liga somente ao DNA dupla fita. O produto da PCR dupla fita é marcado conforme vai sendo sintetizado e pode ser quantificado através de um fluorímetro; a vantagem desta metodologia está na não necessidade de uma sonda, e uma desvantagem potencial é a possibilidade de geração de produtos inespecíficos que podem gerar sinal fluorescente. Outro método, o TaqMan® - utiliza um método de PCR com atividade nuclease 5’ para gerar o sinal fluorescente durante a PCR. Neste sistema, uma sonda é usada com um “reporter dye” e um “quencher dye” ligados. Durante a PCR, a sonda é clivada pela atividade nuclease 5’ da Taq DNA polimerase, separando o “reporter dye” do “quencher dye”, gerando o sinal fluorescente seqüência específica, que é aumentado a cada ciclo. A especificidade deste método é maior, mas requer o uso de sondas especialmente feitas e caras.

A PCR Real-Time é uma técnica simples e produz resultados rápidos (não requer manuseio pós-PCR), permite a quantificação direta e precisa do produto da PCR (DNA e RNA), pode ser apropriada para aplicação em rotina (Bordils et al., 2005).

As inter-relações dos herpes vírus HCMV, HHV-6 e HHV-7 e seu impacto clínico nos pacientes que são submetidos a transplantes de órgãos têm sido pouco estudadas no Brasil. Em virtude da importância clínica de HCMV no pós-transplante e as características compartilhadas entre os beta herpes vírus HHV-6 e HHV-7 e seus efeitos patogênicos já demonstrados por alguns autores foi considerada a relevância do presente estudo em um grupo de transplantados de fígado no Hospital de Clínicas da Unicamp.



## **2- OBJETIVOS**



## **2.1- Principal**

Padronizar, Implantar a antigenemia para HHV-6 e HHV-7 através de imunoperoxidase e realizar a sorologia para HHV-6 por técnica de Elisa.

## **2.2- Secundários**

Estudar a frequência da infecção e co-infecção por HCMV, HHV-6 e HHV-7 em pacientes submetidos a transplante de fígado.

Avaliar a concordância entre os resultados obtidos com as técnicas de N-PCR e antigenemia para os beta herpes vírus estudados.

Correlacionar os resultados obtidos com os achados clínico-laboratoriais.





## **3- CASUÍSTICA**





Trata-se de um estudo observacional, prospectivo, analítico, de coorte, onde foram analisados pacientes acompanhados entre os anos de 2003 a 2006. No total foram acompanhados 53 transplantados na Unidade de Transplante de Fígado do Hospital de Clínicas e no Ambulatório do Gastrocentro da Universidade Estadual de Campinas (UTH - HC - Unicamp). Destes 32 foram selecionados para fazer parte deste estudo.

### **3.1- Critérios de inclusão no estudo**

- Ter mais de 18 anos, independente do sexo;
- Aceitar ser submetido à coleta de amostras de sangue para análise pré-transplante e monitorização pós-transplante por um período de pelo menos 6 meses;
- Comprometer a comparecer a acompanhamento regular;
- Foram incluídos aqueles pacientes que já tinham realizado N-PCR para HCMV, HHV-6 e HHV-7 e a AGM para HCMV (Sampaio, 2006) cujas lâminas estivessem estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  e com material celular fixado em condições adequadas para a implantação, padronização e realização da AGM para HHV-6 e HHV-7;
- Foram incluídos aqueles pacientes que já tinham realizado a sorologia para HCMV e que tivessem soro armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para realização da sorologia para HHV-6.

### **3.2- Critérios de exclusão**

- Foram excluídos os pacientes que evoluíram a óbito no ato cirúrgico ou que não sobreviveram ao primeiro mês pós-transplante;

- Foram excluídos os pacientes que não tiveram um seguimento regular adequado;
- Foram excluídos os pacientes que não tinham lâminas estocadas com material celular íntegro ou soro.
- 

### 3.3- População de estudo

O protocolo foi seguido de acordo com os requerimentos para pesquisas envolvendo seres humanos do Brasil e, foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) sob o número 430/2003 (Anexo A) e adendo concedido em 2008 (Anexo B). Todos os pacientes que participaram deste trabalho foram informados sobre os procedimentos a serem adotados e concordaram com a coleta do material necessário para o estudo mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo paciente ou responsável após todas as dúvidas terem sido esclarecidas.

A monitorização dos pacientes foi realizada prospectivamente desde o pré-transplante (imediatamente antes do ato cirúrgico - dia 0) e no pós-transplante: de modo semanal no 1º e 2º mês (semana 1 a 8), quinzenal no 3º mês (semana 10 e 12) e mensal do 4º mês até o final do 6º mês (semana 16, 20 e 24). O material coletado foi encaminhado ao Laboratório de Hepatologia e Bacteriologia do Gastrocentro-Unicamp, sendo posteriormente estocadas adequadamente até serem utilizadas no presente trabalho.

A imunossupressão básica consistiu de: **a)** inibidores de calcineurina: ciclosporina (0,4mg/kg/dia com nível sanguíneo variando de 150-250ng/ml) ou tacrolimus (0,01mg/kg/dia com nível sanguíneo variando de 5-10ng/ml); **b)** corticosteróides (metilprednisolona 1,0g no intra-operatório com redução no sétimo dia para 20mg até o final do primeiro mês, 15mg no segundo mês, 10mg no terceiro mês, 5mg no quarto mês e retirada se o paciente não for

portador de doença auto-imune); **c)** inibidores de purina (azatioprina na dose de 50mg/dia, ou micofenolato de mofetila na dose de 1000mg/dia ou micofenolato sódico na dose de 720mg/dia).

A profilaxia anti-viral para o *Herpes simplex* foi feita com aciclovir (200mg de 12/12 horas) por dois meses).

Os pacientes não fizeram profilaxia para o HCMV, a não ser que o doador fosse soro-positivo e o receptor soro-negativo. Os pacientes com doença por HCMV, com sintomas clínicos, receberam ganciclovir, por via intravenosa, na dose de 5mg/kg 2 vezes ao dia por 6 semanas.

Conseguiu-se uma população de estudo de 32 pacientes. As análises dessas amostras para a padronização e implantação da AGM para HHV-6 e HHV-7 e a sorologia para HHV-6 foram realizadas no período de 2008 a 2011.

Os achados clínicos dos 32 pacientes foram obtidos das anotações de prontuários próprios da UTH-HC-Unicamp e os laboratoriais foram obtidos eletronicamente.

A mediana da idade dos 32 pacientes inclusos foi de 47 (18-66) anos sendo 20 (62,5%) deles pertencentes ao sexo masculino e 12 (37,5%) ao sexo feminino.

### **3.4- Definição de conceitos**

#### **3.4.1- Critérios para diagnóstico de infecção ativa de HCMV**

A infecção ativa pelo vírus HCMV foi considerada quando se constatou 2 ou mais N-PCR positivos em amostras extraídas de DNA de granulócitos de sangue periférico consecutivos num intervalo de 30 dias segundo critérios propostos por (Ljungman et al., 2002; e Einsele et al., 1995) e/ou antigenemia positiva (1 ou mais células positivas) segundo (Ljungman et al. 2002, Kotton et al., 2010; Milan et al., 2011).

#### 3.4.2- Critérios para diagnóstico de infecção ativa pelo HHV-6

A definição de infecção ativa para o HHV-6 foi baseada na positividade da N-PCR em DNA extraído de leucócitos totais, e/ou antigenemia positiva (1 ou mais células positivas) segundo os relatos de literatura (Lautenschlager et al., 2002; Lautenschlager et al., 2006; Thomasini et al. 2007; Sampaio et al, 2011).

#### 3.4.3- Critérios para diagnóstico de infecção ativa pelo HHV-7

A infecção ativa para o HHV-7 foi definida quando pelo menos uma amostra de soro resultou positiva pela N-PCR e/ou antigenemia positiva (1 ou mais células positivas) (Ihira et al., 2001; Lautenschlager et al., 2002; Feldstein et al., 2003; Thomasini et al. 2007)

#### 3.4.4- Critérios para diagnóstico de co-infecção por HCMV, HHV-6 e HHV-7

A co-infecção ativa foi definida quando dois ou mais vírus foram detectados simultaneamente na mesma amostra (Lautenschlager et al., 2002; Lautenschlager et al., 2006; Sampaio et al., 2011).

#### 3.4.5- Critérios para caracterizar doença por HCMV

Para caracterização de doença por HCMV, além das evidências laboratoriais de infecção ativa citadas anteriormente, fez-se necessário a presença de manifestações clínicas compatíveis com aquelas sabidamente causadas pelo HCMV de acordo com os critérios de (Ljungman et al., 2002; Paya et al., 2002; Kotton et al., 2010).

- Febre: maior ou igual a 38°C, no mínimo por 3 dias sem foco detectado, acompanhada por leucopenia ( $\leq 3.000/mm^3$ ) e plaquetopenia ( $\leq 100.000/mm^3$ ) afastadas outras causas;
- Pneumonia intersticial: sintomatologia de pneumonia (achados radiológicos e/ou hipoxemia);
- Doença gastrointestinal: presença de esofagite, gastrite e/ou colite;
- Hepatite ou colangite: quando houve a detecção em tecido hepático na vigência de alterações enzimática em perfil hepático.
- Doenças neurológicas: presença de encefalite, meningite e/ou mielite, associadas com detecção de HCMV por PCR em líquido cérebro-espinhal;
- Retinite: quando diagnosticada pela oftalmologia do serviço por hemorragia e/ou disfunção visual;
- Nefrite: definida pela detecção da infecção pelo HCMV com a identificação histológica em biópsia de rim obtida do paciente com disfunção renal;
- Miocardite: sempre com identificação histológica convencional em biópsia de coração obtida de pacientes com miocardite.

#### 3.4.6- Critérios para caracterizar provável doença por HHV-6

Para caracterização de doença por HHV-6, além das evidências laboratoriais de infecção ativa citadas anteriormente, fez-se necessário a presença de manifestações clínicas compatíveis com a de HHV-6.

- febre alta ( $>39^\circ C$ ), erupções cutâneas, disfunção hepática (alanina aminotransferase  $>100IU/ml$ ), disenteria, pneumonite intersticial, microangiopatia trombótica, encefalite e principalmente mielossupressão (sendo afastadas outras causas virais e bacterianas) de acordo com o descrito

por (Singh et al., 1996; Ljungman et al., 2002; Sashihara et al., 2002; Boutolleau et al., 2003; Feldstein et al., 2003; Costa et al., 2011).

#### 3.4.7- Critérios para caracterizar provável doença por HHV-7

Para o HHV-7 não há ainda consenso em relação às manifestações clínicas, mas sintomas como febre, encefalite, pneumonite intersticial, hepatites, disfunção e rejeição do enxerto e alterações laboratoriais como leucopenia ( $\leq 3.000/\text{mm}^3$ ) e plaquetopenia ( $\leq 100.000/\text{mm}^3$ ) e associados à AGM positiva (pelo menos 1 célula) e/ou 1 N-PCR positivo foram considerados como doença (Tomasini et al., 2007)

#### 3.4.8- Critérios para caracterizar a infecção bacteriana concomitante

Foram também avaliadas as infecções bacterianas concomitantes e, estas foram definidas como àquelas que ocorreram após a cirurgia e diagnosticadas laboratorialmente. Os episódios clínicos relatados foram comparados e analisados com a presença de infecção ativa para cada um dos vírus estudados.

#### 3.4.9- Critérios para caracterizar a primo-infecção

Foi definido que primo-infecção aconteceu quando o receptor tinha sorologia IgG negativa e recebeu um órgão de doador com sorologia positiva (Von Muller et al., 2006).

### **3.5- Critérios para definir a disfunção e a rejeição do enxerto**

A avaliação da função hepática foi baseada na elevação sérica da alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, gama-glutamil transpeptidase e das bilirrubinas usando-se os padrões e protocolo da UTH-HC-Unicamp.

Episódios de rejeição do enxerto foram documentados baseados em análises histopatológicas de material obtido por biópsia hepática. A classificação de Banff (Demetris et al., 1996) foi utilizado para classificação e determinação do grau e tipo de rejeição celular.







## **4- MÉTODOS**



As amostras de sangue foram coletadas em 2 tubos contendo EDTA e 1 tubo seco nos dias pré-determinados.

Os linfócitos do sangue periférico foram separados para este estudo de antigenemia (AGM) de HHV-6 e HHV-7 e após fixação em lâmina, estas foram armazenadas em freezer a -80° C.

Para a sorologia IgM de HHV-6 por método de ELISA, foi separado 100ul do soro dos pacientes para este estudo e armazenados no freezer a -20°C.

O estudo para o HCMV (PCR e AGM), HHV-6 e HHV-7 (N-PCR) foi realizado anteriormente (Sampaio et al., 2006) e foram utilizadas para análise de tempo de detecção, prevalência de co-infecção e doença e sua influência sobre as outras infecções virais e bacterianas observadas neste estudo.

#### **4.1- Implantação da antigenemia para HHV-6 e HHV-7**

Inicialmente a técnica foi seguida conforme estudo já realizado por (Lautenschlager et al., 2002; Hårma et al., 2006) e no decorrer das análises posteriormente houve necessidade de algumas alterações que estão mencionadas abaixo:

##### **4.1.1- Separação celular**

Para a realização da separação celular do sangue periférico para pesquisa de HHV-6 e HHV-7, adicionou-se 3ml de soro fisiológico gelado ao invés do PBS sobre 3ml de sangue total e a mistura foi homogenizada por três minutos. Em outro tubo adicionou-se 3ml de Ficcoll-Paque (GE Healthcare, Upsalla, Suécia) e a mistura do sangue mais soro.

A seguir o tubo foi levado à centrifugação por 45 min à 2000rpm, e não mais por 40 minutos, e posteriormente transferiu-se o sangue que foi misturado juntamente ao soro. O material coletado foi transferido para o terceiro tubo, completado para 9ml de soro fisiológico gelado e centrifugado por 20 minutos à 1800rpm e não mais por 2.000rpm.

Foi retirado a banda de células mononucleares formadas em meio a solução e transferida para outro tubo onde foi adicionado 2ml de soro fisiológico e levado para centrifugação à 10 minutos por 2.200rpm ao invés de 7 minutos por 2.400rpm. Após a centrifugação foi retirado o sobrenadante e adicionado ao sedimento celular no fundo do cone 2ml de solução lise gelada. O tubo foi levado a centrifugação por 7 minutos à 1800rpm e posteriormente armazenada à refrigeração -20°C por 20 minutos e não mais por 10 minutos.

Após a refrigeração, o tubo com a solução lise foi levado à centrifugação por 5 minutos a 1500rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionado no tubo 1ml de soro gelado, a mistura foi homogenizada em vórtex e realizado a contagem celular através da câmara de Newbawer. Em leitura  $N \times 21 \times 10^4 = 30 \times 21 \times 10^4 - 6,30 \times 10^6, 30 \times 10^6$

#### 4.1.2- Fixação celular para HHV-6 e HHV-7

Adicionou-se o material no citofunil conforme o nº de células desejado e centrifugou-se por 15 minutos a 800rpm e não mais por 10 minutos. Retiraram-se as lâminas dos citoclipes e fez-se a fixação com imersão em acetona absoluta gelada por 7 minutos. E não mais por 5 minutos.

As lâminas foram embrulhadas em papel manteiga e papel alumínio e permaneceram armazenadas em freezer á menos 80°C até o momento das reações para este estudo.

#### 4.1.3- Reação monoclonal para HHV-6

Nesta etapa da técnica realizada houve algumas alterações em diluições e monoclonais. Ao invés da utilização do monoclonal MAB8533, este foi substituído nesta técnica pelo monoclonal C65206M (marca *Biodesign International, France*). Realizou-se diluição de 1:10 de C65206M e MAB8535 em PBS e acrescentou BSA (soro fetal bovino) e adicionou-se 30ul ao invés de 35ul destas diluições sobre as lâminas com o material celular fixado. As lâminas foram incubadas em câmara úmida à 37°C (*overnight*), e posteriormente realizado processo de lavagem por três vezes em PBS e imersas por sete minutos.

Após a retirada das lâminas armazenadas em estufa, foi realizado processo de lavagem com PBS. Realizou-se diluição de 1:50 PBS gelado e BSA (soro fetal bovino) com o conjugado Z0412-1 (soro de coelho anti-IgG de camundongo da marca DAKO - CA, USA) substituindo o conjugado DAKO Z0456, CA USA. Trinta e cinco microlitros desta diluição e não mais 40ul foi adicionada em cada lâmina e estas foram levadas à estufa à 37°C por 50 minutos ao invés de 60 minutos. As lâminas foram mergulhadas três vezes em PBS gelado e ficaram imersas por sete minutos em substituição aos cinco minutos anteriormente padronizados.

Posteriormente foi realizada a diluição de 1:150 com PBS/BSA e o conjugado soro de cabra anti-IgG de coelho marcado com peroxidase 81-6120 (marca *Zymed - CA, USA*), foi aplicado 35ul desta diluição sobre cada lâmina e não mais 40ul como anteriormente, que ficaram incubadas por 1 hora à 37°C. Foi realizada a lavagem com PBS gelado para retirada de excesso de reagente por 2 vezes.

Foi aplicado solução 50ul de solução AEC/peróxido de hidrogênio sobre as lâminas e esperou-se 15 minutos, ficando em local escuro à temperatura ambiente. A seguir as lâminas ficaram mergulhadas em um cuba contendo solução tampão acetato uma vez por 10 minutos.

A solução tampão acetato foi desprezada e adicionou-se H<sub>2</sub>O deionizada por 1, 3, 5 e 7 minutos respectivamente. Após se desprezar H<sub>2</sub>O, incubou-se as lâminas em hematoxilina e as mesmas foram deixadas imersas por um minuto. Posteriormente as lâminas foram lavadas delicadamente em água corrente e após a secagem foi adicionado uma gota de glicerina sob a delimitação celular para a realização da leitura em microscópio óptico (40x)

#### 4.1.4- Reação monoclonal para HHV-7

O protocolo de reação para HHV-7 seguiu o descrito para a reação de antigenemia para HHV-6 com algumas alterações dos reagentes utilizados. Foram utilizados anticorpos monoclonais para detectar antígenos precoces e tardios do HHV-7 respectivamente e mais dois conjugados marcados com peroxidase. Foram realizados as diluições de 1:20 em PBS/BSA com o anticorpo monoclonal KR4 (*Advanced Biotechnologies, Canada*). Esta diluição foi adicionada 40ul e não mais 35ul sobre a delimitação celular exposta na lâmina e incubada em câmara úmida e levada à estufa em temperatura de 37°C por 45 minutos e não mais 60 minutos como anteriormente.

Após este período foi realizado o processo de lavagem com PBS por três vezes e as lâminas foram imersas em PBS gelado por sete minutos ao invés de 5 minutos. Realizou-se a seguir a diluição de 1:40 em PBS/BSA com soro de coelho anti-imunoglobulina de camundongo marcado com peroxidase (P260-*Dako Cytomation, USA*), e aplicou-se 40ul ao invés de 35ul.

As lâminas foram novamente incubadas à 37° por 45 minutos, ao invés de 60 minutos, e armazenadas em câmara úmida. Após este período realizou-se três processos de lavagens com PBS e as lâminas ficaram imersas em cuba com PBS gelada por mais sete minutos.

Foi realizada a terceira diluição de 1:125 com PBS/BSA e o soro de cabra anti-Imunoglobulina G de coelho 81-6120 marcada com peroxidase (marca *Zymed, CA, USA*), foi aplicado 40ul sobre a delimitação celular da lâmina e

incubadas à 37°C por 1 hora. A seguir as lâminas foram lavadas como anteriormente por três vezes e imersas por 7 minutos em PBS gelado.

Após a imersão das lâminas em PBS, foi feita a contra coloração com Hematoxilina de Mayer, por 1 minuto. As lâminas foram enxaguadas em água corrente delicadamente para não danificar a integridade celular. Após este procedimento foi aplicada a glicerina tamponada e em seguida realizada da leitura e interpretação em microscópio óptico 40 x (vezes).

#### 4.1.5- Interpretação da leitura (HHV-6 e HHV-7)

Foi utilizado um microscópio óptico, marca *Nikon (Zeiss, Alemanha)* aumento de 40 vezes e foram observadas:

- **Células HHV-6/HHV-7 antígeno positivas:** citoplasma da célula corado em marrom;
- **Células HHV-6/HHV-7 antígeno negativas:** citoplasma da célula corado em azul.

#### 4.2- Sorologia por técnica da imunoperoxidase IgM Elisa para HHV-6

O teste de Elisa para IgM (imunoglobulina M) contra o herpes vírus humano (HHV-6) destina-se à detecção qualitativa de anticorpos. Primeiramente amostras de soro que permaneciam estocadas a freezer -20°C foi aliquoteada 30ul em tubos de *ependorf* e centrifugadas a 10.000rpm por 15 minutos, para que se pudesse garantir uma amostra não lipêmica.

#### 4.2.1- Pré-diluição e absorção do soro

A seguir foi realizado em tubo falcon a preparação da solução tampão de lavagem (Solução salina tamponada com fosfato - pH 7,2 a 7,6 - 20x). A diluição foi feita em 1 para 20 da solução tampão diluída em água destilada. Foi diluído o reagente controle negativo, reativo e o calibrador em triplicatas.

O soro centrifugado foi alíquotado 5ul do sobrenadante para a realização da sorologia IgM. Foi realizada outra diluição em 1 para 100ul do soro e da solução tampão.

#### 4.2.2- Aplicação das amostras na placa de Elisa

Foi adicionado em cada pocinho da placa de Elisa (Kit marca Panbio/Austrália) 100ul dos calibradores e das amostras dos respectivos pacientes. A seguir a placa foi coberta e armazenada em temperatura ambiente por 30 minutos.

Após este período foi realizado o processo de lavagem por 6 vezes. Foi adicionado posteriormente o conjugado (anti-IgM humana Conjugada à HRP) sobre os pocinhos e armazenado em temperatura ambiente por mais 30 minutos, a seguir realizou-se novamente o processo de lavagem por 6 vezes. Foi adicionado após a lavagem um substrato (ácido fosfórico) que tem como finalidade a interrupção da reação, esta solução depois de adicionada sobre os pocinhos permanecendo submersa por 10 minutos em local escuro.

#### 4.2.3- Leitura da placa de Elisa

Após este período a placa de Elisa foi levada para a leitura da absorbância de cada pocinho em equipamento espectrofotometria Cobas CORE, que utiliza comprimento de onda de 450nm com um filtro de referência de 600 a 650nm.



#### 4.2.4- Cálculos e interpretação dos resultados

Foi realizado o cálculo da absorbância média das triplicatas do calibrador e multiplicado pelo fator de calibração, para que se pudesse ter o valor de corte. O valor de corte encontrado foi dividido sobre o valor da absorbância da amostra (número de leitura da absorbância) para obter os valores indexadores referentes ao resultado que indica o teste. Após estes cálculos os valores indexadores acima de 1,1 foram considerados positivos, abaixo de 0,9 negativos e valores de 0,9 a 1,0 considerado duvidosos.

#### 4.3- Análise estatística

Foram contabilizados para efeito de análise os episódios de positividade das reações realizadas de acordo com a técnica empregada.

A comparação de variáveis categóricas foi feita usando-se o teste qui-quadrado com uso do teste exato de Fisher quando necessário utilizando-se o programa Statistica 7.0 (CA, USA).

Usou-se o teste de acurácia através de tabela de contingência (2x2) para verificação da sensibilidade, especificidade e valores preditivos negativos e positivos de cada teste diagnóstico realizado.

Houve significância estatística quando o  $p > 0,05$ .

#### 4.4- Apoios recebidos

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Cirurgia pelo fornecimento do material de consumo obtido com verba PROAP.

#### 4.5- Referências bibliográficas

Foram seguidas de acordo com as normas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.





## **5- RESULTADOS**



Todos os resultados obtidos constam no Anexo 3.

Os dados laboratoriais das amostras e os achados clínicos estão compiladas no Anexo 4.

Os sintomas que auxiliaram no diagnóstico das doenças causadas pelos beta-herpes vírus estão no Anexo 5.

A presença de doença detectada de acordo com os beta-herpes vírus estudados e a semana de coleta se encontra no Anexo 6.

A sorologia IgG (imunoglobulina G) para HCMV foi positiva em 87,5% (28/32) dos pacientes no dia 0 do estudo.

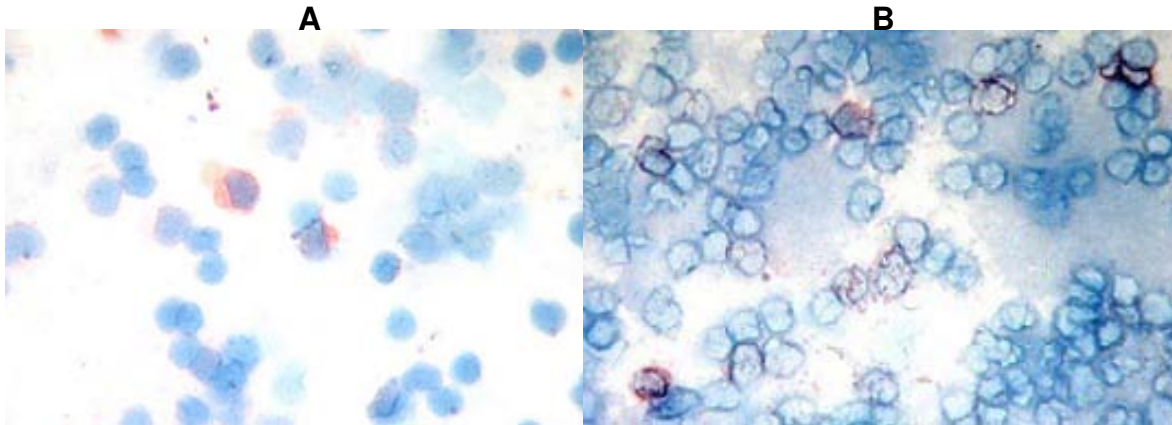
A sorologia IgM para HHV-6 foi positiva em 15,6% (5/32) dos pacientes no dia 0 do estudo em 25% (8/32) na semana 4, em 40,6% (13/32) na semana 12 e em 46,9% (15/32) na semana 24.

Um total de 92 amostras positivas de N-PCR para HCMV foi detectado em 26 (26/32=81,2%) casos sendo que 16 (16/32=50%) apresentaram a doença por HCMV.

Houve 13 episódios de rejeição celular aguda em oito pacientes (8/32=25%), porém somente dois (2/13=15,4%) foram associados à doença HCMV e dois (2/13=15,4%) a doença HHV-6.

Houve 26 (26/32=81,2%) episódios de infecção bacteriana e em 13 (13/26=50%) deles houve associação com a doença HHV-6 e HCMV.

Um total de 32 amostras positivas de antigenemia para HCMV foram detectada em 15 (46,9%) casos sendo que 16 (16/32=50%) apresentaram a doença por HCMV. Sendo que a maioria das manifestações clínicas foram disfunções gastrintestinais acompanhadas de febre. Dentre os pacientes com doença por HCMV, somente um deles teve a antigenemia negativa.



**Figura 3-** Fotomicrografia ótica de linfócitos positivos para antígenos do HHV-6 (A) e HHV-7 (B) (antigenemia) detectados no estudo

Um total de 90 amostras positivas de antigenemia para HHV-6 foi detectada em 20/32 (62,5%) casos sendo que 15/32 (46,8%) apresentaram a doença por HHV-6.

Um total de 28 amostras positivas de N-PCR para HHV-7 foi detectado em 15 (15/32=46,8%) casos e destes 5 (5/32=15,6%) apresentaram a doença por HHV-7.

Um total de 23 amostras positivas de antigenemia para HHV-7 foi detectada em 7 (7/32=21,8%) casos sendo que destes 5/32 (15,6%) apresentaram a doença por HHV-7.

Detectou-se que 50% dos pacientes estudados foram diagnosticados com a doença HCMV. A doença causada pelo HHV-6 foi observada em 46,8% dos pacientes e em 15,6% houve detecção de doença por HHV-7.

A doença causada pelo HCMV foi detectada isoladamente em 4 (4/16=25%) pacientes e em somente 1 (6,6%) dos pacientes portadores de HHV-6.

A concomitância de doenças foi observada nos pacientes com HCMV e HHV-6 em 7 (21,9%) casos e de 5 (15,6%) pacientes com HHV-6 e HHV-7.

Não foi observada concomitância de doença HCMV e HHV-7 e em nenhum dos três vírus estudados.

De acordo com a semana de coleta (Tabela 2) pode ser observado que mesmo que alguns doentes fossem portadores de mais de uma infecção considerou-se a concomitância de doença quando esta foi detectada na mesma amostra estudada referente ao mesmo tempo de coleta.

A positividade dos exames realizados de acordo com a semana de coleta e o tipo de beta-herpes vírus encontram-se descritos nas Figuras 4, 5 e 6.

Para os beta-herpes vírus estudados houve positividade dos exames e o pico se deu entre a quinta e a sétima semana, e após este período ocorreu declínio conforme pode ser observado nas Figuras 5, 6 e 7.

A doença causada pelo beta-herpes vírus estudada foi detectada na primeira semana até a décima semana, apresentando pico máximo ao redor da quinta semana.

Observou-se somente 2 (2/16) episódios de re-infecção para os portadores de HCMV.

Foi observado que os episódios de doença para HHV-6 e HHV-7 apareceram ao redor da primeira semana e antes do aparecimento da doença por HCMV (Figura 8).

Observou-se altos índices de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) para antigenemia do HCMV em relação ao N-PCR assim como observado nos resultados para HHV-6 e HHV-7. (Tabela 3)

A sensibilidade, especificidade, valores preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) teste de acurácia, prevalência e razão de verossimilhança (RV) dos testes HCMV, HHV-6 e HHV-7 de acordo com a técnica realizada estão descritos na Tabela 3.

A positividade dos exames realizados de acordo com a semana de coleta e o tipo de beta-herpes vírus encontram-se descritos nas Figuras 5, 6 e 7.

Para os beta-herpes vírus estudados houve positividade dos exames e o pico se deu entre a quinta e a sétima semana, e após este período ocorreu declínio conforme pode ser observado nas Figuras 5, 6 e 7.

A doença causada pelo beta-herpes vírus estudados foi detectada da primeira semana até a décima semana, apresentando pico máximo ao redor da quinta semana.



**Tabela 2-** Casos de doenças diagnosticadas (S) e concomitância de doença (mesma amostra) de acordo com a semana(S1 a S24) de coleta

Paciente	HCMV	HHV-6	HHV-7	HCMV/HHV-6	HHV-6/HHV-7
1		S	S		S1
2	S	S		S5/S6	
3	S				
4	S	S		S2/S3	
5	S				
8	S	S			
9	S	S		S5	
11	S	S		S4	
12	S	S			
13		S	S		S1
14	S	S	S		S5/S16
15	S				
18	S				
19	S	S		S2	
20	S	S	S	S4/S5	S1
21	S	S	S		S1
25	S	S		S3/S4/S5/S6	
27		S			
28	S	S			
<b>Total</b>	<b>16 (50%)</b>	<b>15 (46,8%)</b>	<b>5 (15,6%)</b>	<b>7 (21,9%)</b>	<b>5 (15,6%)</b>

Foi observado que os episódios de doença para HHV-6 e HHV-7 apareceram ao redor da primeira semana e antes do aparecimento da doença por HCMV (Figura 7).

Foi observado somente dois ( $2/16=33,3\%$ ) casos de re-infecção por HCMV e um caso ( $1/15=6,6\%$ ) por HHV-6 e um caso ( $1/5=20\%$ ) por HHV-7.

Ocorreu primo-infecção para o HCMV em quatro ( $4/32 = 12,5\%$ ) casos.

Em relação aos outros beta-herpes vírus esta informação foi inviabilizada por não ter sido realizada sorologia específica dos respectivos doadores.

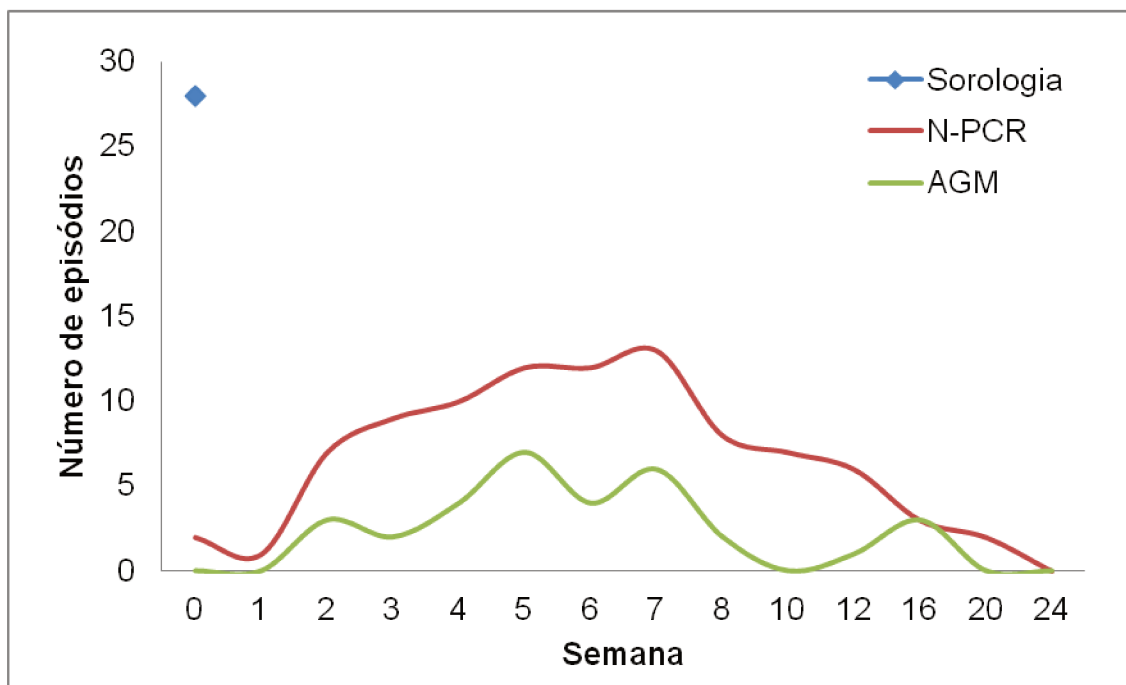
Não foi detectada nenhuma co-infecção para os três vírus concomitantemente. Observou-se 16 episódios de co-infecção para os vírus HCMV e HHV-6, dois episódios para HCMV e HHV-7 e 13 episódios para HHV-6 e HHV-7.

A concomitância da infecção para HCMV/HHV-6 foi mais acentuada ao redor da quinta semana. Neste período a co-infecção por HHV-7/HCMV e HHV-7/HHV-6 também ocorreu em menor número (Figura 8).

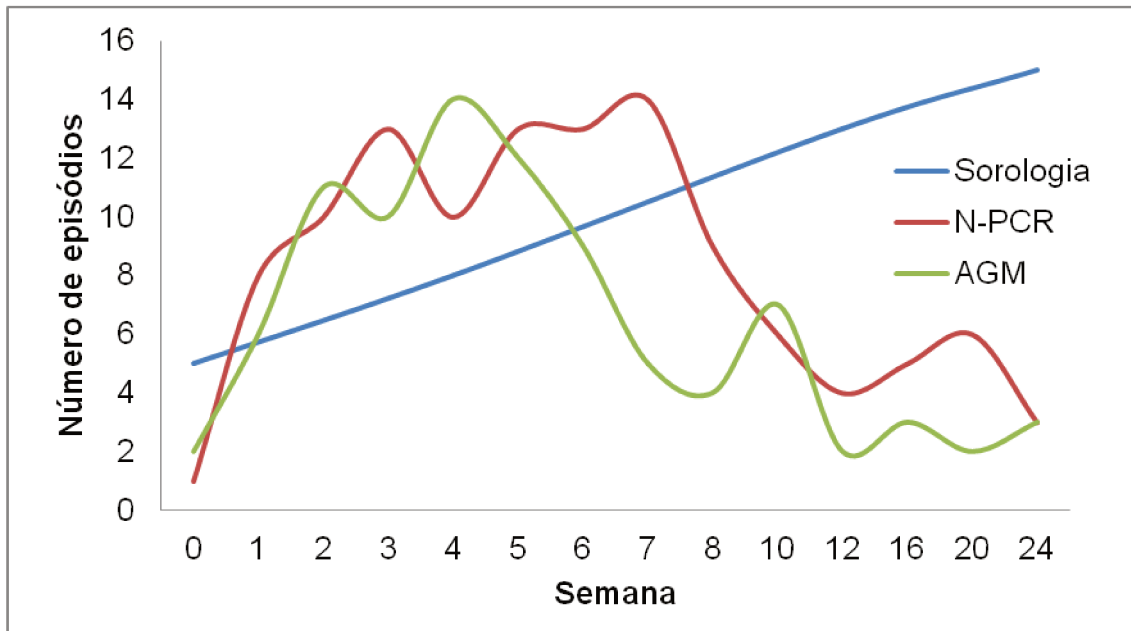
**Tabela 3-** Sensibilidade, especificidade, valores preditivo positivo e negativo teste de acurácia, prevalência e razão de verossimilhança (RV) dos testes HCMV (citomegalovírus), HHV-6 (human herpes vírus 6) e HHV-7 (human herpes vírus 7) de acordo com a técnica realizada

	HCMV		HHV-6		HHV-7	
	N-PCR	AGM	N-PCR	AGM	N-PCR	AGM
<b>Sensibilidade</b>	100.0%	93.8%	100%	93.3%	100.0%	80.0%
<b>Especificidade</b>	37.5%	100.0%	35%	64.7%	63.0%	88.9%
<b>Valor Preditivo Positivo</b>	61.5%	100.0%	58%	70.0%	33.3%	57.1%
<b>Valor Preditivo Negativo</b>	100.0%	94.1%	100%	91.7%	100.0%	96.0%
<b>Acurácia</b>	0.687	0.968	0.66	0.78	0.687	0.870
<b>Prevalência</b>	0.500	0.5	0.47	0.46	0.156	0.156
<b>RV+</b>	1.600	-	1.55	2.64	2.700	7.200
<b>RV-</b>	0.000	0.0625	0.00	0.10	0.000	0.225

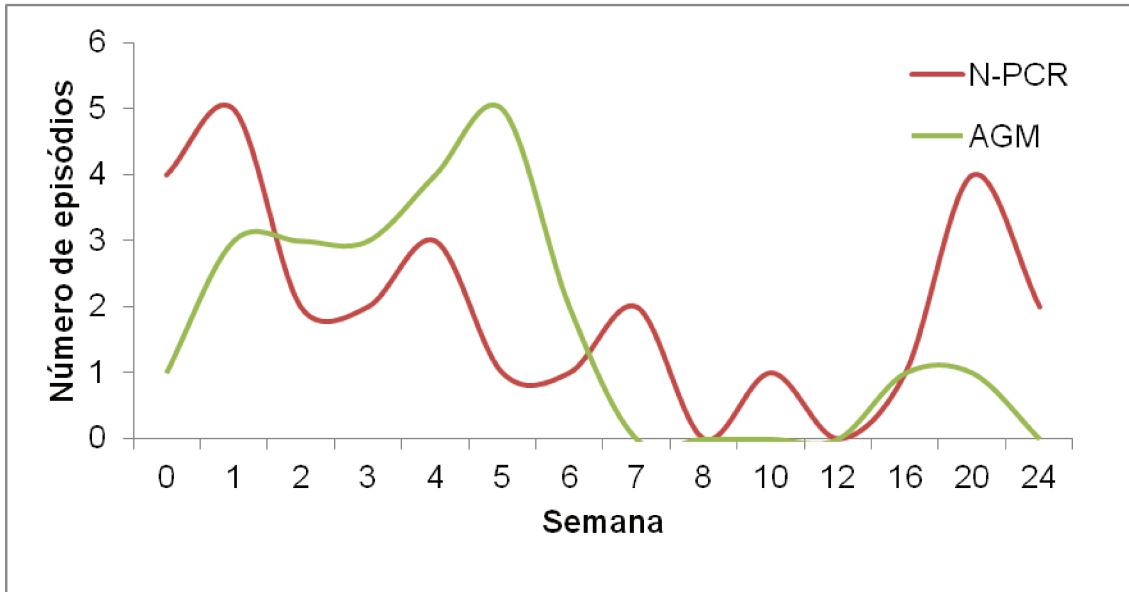
**RV+=** razão de verossimilhança positiva; **RV=-** razão de verossimilhança negativa;  
**AGM=** antigenemia; **N-PCR=** *nested protein chain reaction* (reação da cadeia polimerase)



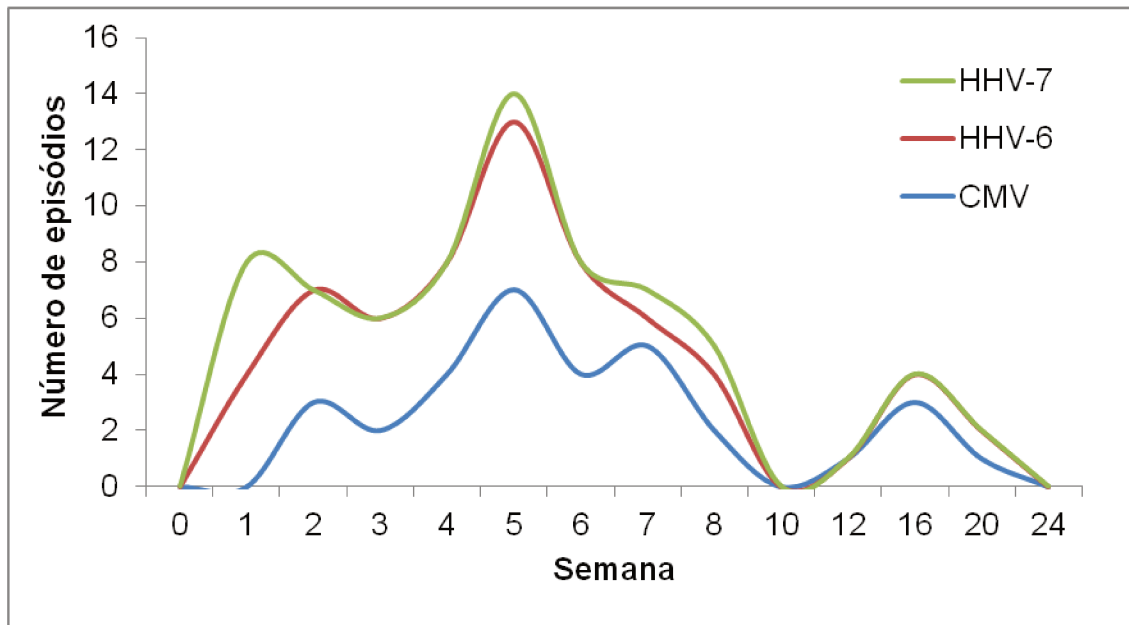
**Figura 4-** Número de episódios de positividade dos exames de sorologia IgG (imunoglobulina G), N-PCR (*nested protein reaction*) e AGM (antigenemia) para HCMV (citomegalovirus) de acordo com a semana de coleta



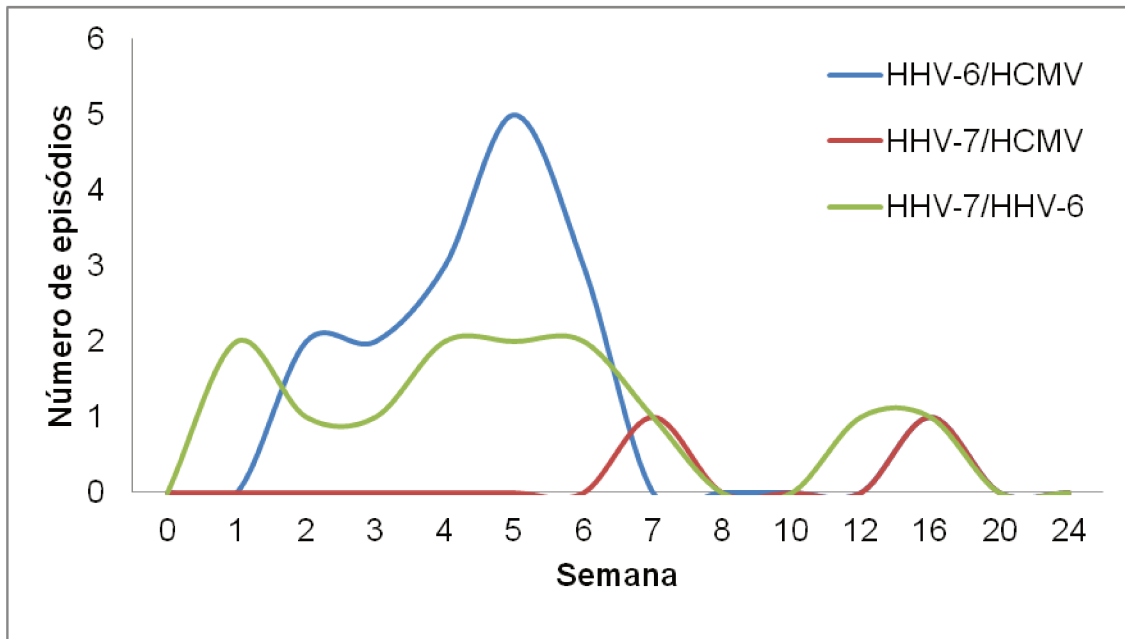
**Figura 5-** Número de episódios de positividade dos exames de sorologia IgM (imunoglobulina M), N-PCR (*nested protein reaction*) e AGM (antigenemia) para HHV-6 (*human herpes virus 6*) de acordo com a semana de coleta



**Figura 6-** Número de episódios de positividade dos exames N-PCR (*nested protein reaction*) e AGM (antigenemia) para HHV-7 (*human herpes vírus 7*) de acordo com a semana de coleta



**Figura 7-** Número de episódios de doença viral detectada de acordo com a semana de coleta (HCMV=citomegalovírus; HHV-6=human herpes vírus 6; HHV-7=human herpes vírus 7)



**Figura 8-** Número de episódios de doença concomitantes (co-infecção) detectadas de acordo com a semana de coleta (HCMV=citomegalovirus; HHV-6=human herpes vírus 6; HHV-7=human herpes vírus 7)



## **6- DISCUSSÃO**





A infecção por HCMV após o transplante de órgãos é uma das complicações virais mais importantes que pode acometer o paciente (Lautenschlager et al., 2002; Lautenschlager et al., 2006; Bonon et al., 2005; Hårma et al., 2006; Thomasini et al., 2007; Sampaio et al., 2011; Costa et al., 2011; Milan et al., 2011; Scott et al., 201; Gaurdia et al., 2011). E esta importância neste contexto, torna-se ainda mais evidente quando se observa que pode estar relacionada a uma miríade de complicações, como doenças oportunistas, rejeição celular aguda e crônica, infecções bacterianas, dentre outras (Seehofer et al., 2002; Linghi et al., 2004).

Também tem sido relatado que HHV-6 e HHV-7, as reativações são frequentemente ocasionadas nestes grupos, e tais estudos tem investigado co-fatores que podem afetar a gravidade da infecção por HCMV em pacientes submetidos a transplantes de órgãos (Lautenschlager et al., 2002; Hårma et al., 2006; Thomasini et al., 2007; Sampaio et al., 2011) Dentre os principais co-fatores está a infecção múltipla por estes dois outros beta-herpes vírus que podem favorecer o progresso da doença por HCMV (Lautenschlager et al., 2002; Pasca et al., 2003; Lautenschlager et al., 2006; Harma et al., 2006).

Entre os aspectos clínicos assim como HCMV, o HHV-6 pode causar disfunção do enxerto no transplante de fígado (Costa et al., 2011; Guardia et al., 2011), embora o aspecto clínico de HHV-7 ainda não esteja totalmente esclarecido.

Assim como o citomegalovírus humano (HCMV) o herpes vírus humano 6 (HHV-6) e o 7 (HHV-7), são vírus universais pertencentes à subfamília dos beta-herpes vírus, e apresentam alta prevalência na população. Após primo-infecção estes vírus permanecerão por toda vida no organismo (Lautenschlager et al., 2006) e podendo se reativar em condições de imunossupressão (Hårma et al., 2006)

Vários autores demonstraram a importância da detecção de HCMV no pós-transplante em testes baseados em antigenemia isolada ou associada a testes de N-PCR (Lautenschlager et al., 2006; Sampaio et al., 2011).

Também tem sido relatado utilização destas técnicas para as detecções destes outros dois beta-herpesvírus que HHV-6 e HHV-7, uma vez que, as reativações são frequentemente ocasionadas nestes grupos (Lautenschlager et al., 2006; Hårma et al., 2006; Tomasini et al., 2007; Sampaio et al., 2011).

Nesse estudo, investigou-se a incidência das infecções pelos beta-herpes vírus HCMV, HHV-6 e HHV-7 através de N-PCR, antigenemia e sorologia, e procurou-se determinar as correlações dos testes aplicados com os possíveis fatores de riscos relacionados ao impacto clínico após o transplante de fígado. As reativações da infecção por HHV-6 são frequentemente encontradas em conjunto com infecção por HCMV em receptores de fígado (Humar et al., 2002; Lautenschlager et al., 2002a).

A mediana de idade dos 32 pacientes incluídos no trabalho foi de 47 (18-66) anos, sendo a maioria dos pacientes estudados do gênero masculino, representando 62,5 % da população.

A grande maioria da população mundial é soropositiva para HCMV, e (Szczepura et al., 2006; Kochs et al., 2006). A apresentação clínica do HCMV pode variar conforme seu padrão epidemiológico (infecção primária e secundária por reativação ou reinfecção).

A doença pode resultar tanto de uma infecção primária, como de uma infecção secundária, embora as infecções primárias normalmente causem doenças mais graves. (Veronesi et al., 2002). A infecção em indivíduos imunocompetentes costuma ser assintomática ou apresentar quadro clínico discreto (Costa et al., 1999).

A infecção primária quando ocorre em indivíduos imunocomprometidos é frequentemente sintomática (cerca de 40%-60% dos casos). A incidência de doença sintomática nos casos de reativação é menor que 20% e na reinfecção, 40% dos pacientes apresentam manifestações clínicas (Costa et al., 1999, Veronesi et al., 2002).

Contudo a incidência e o espectro da doença em imunocomprometidos como é o caso de indivíduos transplantados, quimioterápicos e portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) conferem a este vírus importante destaque como patógeno humano, podendo ter manifestações clínicas graves, rejeições e/ou até mesmo evoluir ao óbito se não tratada à tempo (Lautenschlager et al., 2002; Tomasini et al., 2008; Weigand et al., 2010).

O diagnóstico precoce da infecção ativa por HCMV é importante, uma vez que estudos recentes demonstraram que o tratamento precoce reduz efetivamente a morbi-mortalidade causada pelo HCMV.

O uso da técnica de sorologia, no período pré-transplante, é justificado pela importância da determinação da susceptibilidade à infecção primária (Chou et al., 1990). Considerando a alta soroprevalência do HCMV em populações de adultos, a realização de sorologia permite a detecção de populações de risco para infecção primária e para reinfecção ou reativação virais (Brugman et al., 1993).

Em doadores e receptores de fígado estudos realizados indicaram prevalência em 90% a 100% de anticorpos anti HCMV (Costa et al., 1999).

A avaliação sorológica em pacientes imunocomprometidos é muito importante, na medida em que a detecção de anticorpos específicos reflete infecção prévia, com todas as pessoas soropositivas sendo portadoras do HCMV.

No presente estudo observou-se uma prevalência de 87,5% de indivíduos soropositivos para HCMV (IgG positiva), no pré transplante, sendo este achado compatível com a da literatura, que apontam a prevalência de infecção por HCMV em torno de 80%-100% da população brasileira (Costa et al., 1999; Almeida et al., 2001).

Em estudos europeus de (Rayes et al., 2001; Norris et al., 2002), a prevalência de sorologia nos doadores foi de 68,3% e 56%, enquanto nos receptores foi de 63,3% e 62,6%, respectivamente. E em achados da prevalência

de HCMV em população norte americana (Singh et al., 2000) demonstrou que os doadores apresentavam sorologia positiva em 77,2% dos casos e os receptores, 59%. Na China, (Lianghui et al., 2004) encontraram sorologia positiva em 67,4% dos receptores de transplantados de fígado.

A re-infecção de HCMV neste estudo ocorreu em dois casos e foi possível observar casos primo-infecção para o HCMV em quatro dos pacientes.

O status sorológico do doador e do receptor, em relação ao HCMV, no período pré-transplante, tem sido reconhecido como um fator de risco para a ocorrência de infecção após o enxerto (Freeman et al., 2004).

Para o HHV-6, estudos soro-epidemiológicos, realizados por (Saxinger et al., 1988; Levy et al., 1990), sugerem que mais de 90% dos adultos são soropositivos para a infecção pelo HHV-6. A infecção ocorre em todo o mundo, (Okuno et al., 1989; Krueger et al., 1998; Dockrel et al., 2003)

Estudo realizado no Brasil, em Belém do Pará, mostrou a soroprevalência do HHV-6 de 90%, com taxa de soropositividade variando entre 75% a 100% nos diferentes grupos estudados entre idade e sexo (Freitas et al., 1997).

Neste estudo em relação ao HHV-6 não foi possível a realização da sorologia dos respectivos doadores para determinação de infecção primária, reinfecção ou reativação. A pesquisa de anticorpos IgM para HHV-6 foi detectada em cinco pacientes (15,6%) no pré transplante. Consecutivamente, na quarta semana após o transplante oito (25%) pacientes apresentaram IgM positiva, 13 (40%) na décima segunda semana e em 15 (46%) na vigésima quarta semana após o enxerto.

Pelos resultados de IgM citados acima sugere infecção primária ou uma reativação da doença após o enxerto, pois houve consecutivamente um aumento dos títulos de IgM no decorrer das semanas e em muitos casos correlações com a antigenemia ou PCRs positivos.

Para o HHV-7 estudos de soroprevalência no Brasil (região norte) apontaram em torno de 93 % de positividade em adultos e em crianças maiores que 10 anos de idade que apresentam anticorpos de classe IgG do HHV-7, segundo estudos de (Freitas et al., 2004). A sorologia de HHV-7 não foi possível ser realizada no presente estudo.

Estudos anteriores utilizando N-PCR em DNA extraído de leucócitos totais periféricos propuseram que seja considerada infecção ativa por HCMV apenas quando duas ou mais amostras consecutivas fossem positivas. Este critério visa desconsiderar infecções latentes e viremias transitórias devido à alta sensibilidade da PCR (Ljungman et al., 2002).

Portanto neste estudo, a infecção ativa para HHV-6 e HCMV foi considerada quando havia a presença de 2 N-PCR positivos consecutivos em menos de 30 dias ou a presença de pelo menos uma célula na AGM destes vírus. Em relação ao HHV-7 apenas 1 resultado seja de PCR ou de AGM foi considerado infecção. Isto pode ser justificado porque uma vez que a amostra utilizada foi obtida do soro detectando a presença viral em replicação segundo (Ihira et al., 2001; Feldstein et al., 2003; Tomasini et al., 2007).

A detecção para HCMV pela N-PCR em 26 (81,2%) pacientes e destes 16/32 (50%) apresentaram manifestações clínicas caracterizando a doença HCMV.

A detecção de HHV-6 através da N-PCR realizada por sangue periférico foi observada em 26 (81,2%) pacientes sendo que 15 destes (46,8%) casos apresentaram a doença por HHV-6 e dois tiveram rejeição celular.

A N-PCR para o HHV-7, realizada através do soro, nos 32 pacientes mostrou uma positividade em 15 (46,8%) deles, e destes apenas cinco (15%) apresentaram manifestações clínicas compatíveis com doença por HHV-7.

O HCMV, HHV-6 e HHV-7 foram detectados como infecção ativa após transplante hepático em 50%, 46,8 % e 15,6% respectivamente. Em pacientes adultos transplantados hepáticos, (Griffiths et al., 1999) também encontraram DNA

do HCMV em 47%, DNA do HHV-6 em 32% e DNA do HHV-7 em 48% dos pacientes (Ihira et al., 2001) encontraram DNA do HHV-6 em 38% e DNA do HHV-7 em 40% dos pacientes nas primeiras 8 semanas após transplante hepático (Humar et al., 2000) encontraram DNA do HCMV em 63,6% e DNA do HHV-6 em 54,5% dos transplantados hepáticos.

A diferença encontrada entre os trabalhos depende da sensibilidade dos testes, tipo de transplante, protocolo de imunossupressão, tamanho da amostragem usada e diferenças entre sujeitos. Contudo, o índice encontrado neste estudo foi relativamente similar a outros já publicados.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram correlação com dados da literatura (Härma et al., 2006) e a grande importância destes agentes como causadores de morbidade em pacientes transplantados hepáticos, pela sua alta prevalência nesta população, e associação tanto com complicações infecciosas quanto à rejeição do enxerto.

Na presente casuística a detecção da infecção se concentrou nos cinco primeiros meses de seguimento, período importante de adaptação pós-operatória em que o uso e controle da imunossupressão podem ser críticos.

A positividade para HHV-7 e HHV-6 foi detectada desde o dia 0 do estudo. Isto fez com que a ordem de reativação ou infecção nos transplantados fosse HHV-7 seguido pelo HHV-6 e, por último o HCMV. Isto sugere que HHV-7 pode ter reativado infecções latentes por HCMV e HHV-6.

Um efeito regulatório da expressão do epitopo CD4 em linfócitos provocado por HHV-7 foi descrito e um possível efeito imunomodulatório *in vivo* pode existir e ser atribuídos com o HHV-6 (Sechiero et al., 1998).

A associação com infecções oportunistas foram observadas em 50% dos casos no período de aparecimento da positividade destes vírus.

De acordo com estudos recentes há prevalências elevadas de HHV-7 após transplante de fígado (Lautenschlager et al., 2006; Tomasini et al., 2010)

Através do teste de antigenemia, os antígenos HCMV são detectados atualmente em núcleos de neutrófilos, enquanto a detecção de HHV-6 e HHV-7 antígenos ocorre principalmente no citoplasma dos linfócitos, devido às características biológicas de replicação destes vírus (Lautenschlager et al. 2006; Hārma et al., 2006)

A realização de N-PCR e AGM simultaneamente é útil para o diagnóstico de infecções por beta-herpes vírus, após o transplante hepático, e principalmente a antigenemia tem sido bastante utilizada como uma ferramenta de diagnóstico no auxílio para a correlação com a clínica no pós-operatório.

A antigenemia pode ser considerada uma técnica que é mais rápida e mais fácil de realizar, exigindo pouco equipamento, e é relativamente fácil de interpretar se for processada por profissional qualificado. No entanto, antigenemia sempre requer amostras de sangue fresco e células previamente fixadas em lâminas que podem ser congeladas até a segunda fase do teste, onde são aplicadas as reações com anticorpos monoclonais para a detecção viral.

A detecção de antígenos virais indica que há replicação viral dentro das células, podendo ser mais eficiente para discriminar entre infecções latentes e ativas (Loginov et al., 2006). Assim, as células positivas podem ser detectadas em um padrão de nível de significância estabelecido.

A outra vantagem da antigenemia é que o uso da coloração por imunoperoxidase não requer um microscópio de fluorescência se tornando uma técnica mais simples e de baixo custo.

Raríssimos trabalhos envolvendo antigenemia para o HHV-6 e HHV-7 são encontrados na literatura dificultando uma análise comparativa. Diagnóstico rápido para infecções ativas de HCMV tem alta sensibilidade e especificidade com alto valor preditivo para doença (VPP 90 a 100%) (The et al., 1992; Costa, 1999).

Neste estudo observou-se altos índices de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN para antigenemia do HCMV em relação ao N-PCR assim como observado nos resultados para HHV-6 e também em relação ao HHV-7.

Para o HCMV a sensibilidade da N-PCR foi de 100% e especificidade de 37,5%, valor preditivo positivo de 61,5% e negativo de 100%. A sensibilidade de N-PCR para HHV-6 foi de 100 %, e a especificidade de 35%, valor preditivo positivo de 58% e valor preditivo negativo de 100%, e para o HHV-7 a sensibilidade de N-PCR foi de 100 %, e a especificidade de 63%, valor preditivo positivo de 33% e valor preditivo negativo de 100%.

Para os testes de antigenemia realizados neste estudo, a sensibilidade para o HCMV foi de 93% e especificidade de 100%, valor preditivo positivo de 100% e negativo de 94%. A sensibilidade para HHV-6 foi de 93%, e a especificidade de 64%, valor preditivo positivo de 70% e valor preditivo negativo de 91,7%, e para a antigenemia de HHV-7 a sensibilidade foi de 80%, e a especificidade de 88%, valor preditivo positivo de 57,1% e valor preditivo negativo de 96%.

O presente estudo mostrou boa correlação geral da antigenemia com a Nested-PCR. Para o HCMV a Nested-PCR ofereceu resultado positivo mais precocemente que a antigenemia, isto pode ser explicado pela alta sensibilidade da N-PCR que pode detectar cargas virais baixas e clinicamente não significativas (Mendez, 2001).

Contrariamente, para o HHV-6 e HHV-7 a antigenemia ofereceu resultado positivo mais precoce que a Nested-PCR. Embora o fator responsável por isso não tenha sido claramente identificado, mas a hipótese de que a expressão protéica do vírus nos linfócitos que são albergue do seu genoma ocorra antes que cargas virais significativas circulantes possam ser detectadas por PCR (estágio precoce de replicação viral).



Isso indicaria uma cinética diferente da antigenemia e PCR para HCMV, em que a presença de partículas virais nos neutrófilos indica uma pré-existente alta carga viral circulante (detectável por PCR) proveniente da replicação viral em outras células como as endoteliais (Mendez et al., 2001).

De qualquer maneira, reativações por HCMV, HHV-6 e HHV-7 podem causar problemas clínicos em pacientes, é importante acompanhar as cargas virais após o transplante (Lautenschlager et al., 2000; Lautenschlager et al., 2000; Savolainen et al., 2005; Volin et al., 2004; Bonon et al., 2005; Hårma et al., 2006; Milan et al., 2011; Sampaio et al., 2011). Portanto assim como a detecção de HCMV por antigenemia é usada como um importante diagnóstico de detecção precoce após o enxerto, assim também a antigenemia para HHV-6 e HHV-7 pode ser utilizada.

As infecções ativas pelos vírus HHV-7, HHV-6 ou HCMV podem desenvolver-se independentemente umas das outras, mas houve correlação entre infecções ativas por HCMV e HHV-6.

Foi considerado doenças pelos beta herpes vírus de acordo com critérios já propostos (Ljungmant et al., 2002; Kotton et al., 2010). As manifestações clínicas com aquelas já sabidamente causadas, como a presença de febre maior a 38°C persistente por no mínimo 3 dias, a presença de leucopenia, pneumonia, alterações no trato gastrointestinal, Hepatite, alterações neurológicas, nefrite, retinite ou miocardite. (Paya et al., 2002, Tomasini et al., 2008; Guardia et al., 2011).

A doença causada pelo beta herpes vírus estudados foi detectada da primeira semana até a décima semana, apresentando pico máximo ao redor da quinta semana. Outra observação que pode ser realizada é que os episódios de doença para HHV- 6 e HHV-7 apareceram ao redor da primeira semana e antes do aparecimento de HCMV.

Estudos apontam que em pacientes transplantados, HHV-6 está associado a manifestações febre, erupções cutâneas, pneumonite intersticial, encefalite, associação a doença renal e rejeição do enxerto (Yoshikawa et al., 2001; Hårma et al., 2006).

Outra observação relevante foi que dos quatro pacientes que apresentaram alterações neurológicas, todos tiveram detecções associadas com infecção por HHV-6 ou HHV-7, dentre estes casos, dois pacientes apresentaram quadros de encefalite, mas não foi possível ser confirmados a correlação com HHV-6/HH-7 por não ter sido disponibilizado o líquido cefalorraquidiano LCR para que se pudesse confirmar pela N-PCR.

Foi possível observar também neste estudo as alterações laboratoriais, deve se atentar para as variações agudas dos parâmetros laboratoriais, pois praticamente todos pacientes apresentam alguma alteração laboratorial durante o seguimento sem, no entanto, significar alguma correlação com a infecção por herpes vírus. As alterações laboratoriais onipresentes nesta casuística foram a elevação de enzimas hepáticas, e alterações de hemograma, tais como anemia e plaquetopenia.

Dentre as complicações infecciosas, se destacam as infecções nosocomiais precoces na recuperação, detectadas pelas culturas positivas na maioria dos casos, sendo que em cinco dos pacientes houve evolução para sepse.

Quanto aos quadros de rejeições, foram 13 episódios agudos em oito pacientes, porém somente dois com associação de doença por HCMV e dois com doença por HHV-6, e sem concomitância pelos dois beta herpes vírus.

Das complicações ocorridas durante o seguimento, as alterações laboratoriais se correlacionaram com a concomitante infecção ativa tanto pelo HCMV quanto pelo HHV-6 e HHV-7.

A concomitância de doenças foi observada nos pacientes com HCMV e HHV-6 em 7 (21,9%) casos e de 5 (15,6%) em pacientes com HHV-6 e HHV-7.

Não houve concomitância de doença HCMV e HHV-7 nem dos três vírus estudados.

De acordo com a semana de coleta pode ser observado que mesmo que alguns doentes fossem portadores de mais de uma infecção considerou-se a concomitância de doença quando esta foi detectada na mesma amostra estudada referente ao mesmo tempo de coleta e com sintomas clínicos.

Esta relação indica que a ação imuno-moduladora para estes vírus, descrita em literatura (Secchiero et al., 1998; Tomasini et al., 2007) tem importante papel no desenvolvimento da infecção ativa, mais evidente quando se verifica a tendência da infecção pelo HHV-6 e HHV-7 ser mais precoce que o HCMV.

Este estudo confirma a relevância da infecção pelo HCMV, HHV-6 e HHV-7 nos transplantados. Os resultados descritos neste trabalho mostram que poucos pacientes foram infectados ativamente com mais que um vírus de forma concomitante. Contudo os pacientes com AGM positiva para HHV-7 também o apresentassem para HHV-6 e isto pode ser doença ou reativação concomitante ou reação cruzada.

A reação cruzada entre o HHV-6 e o HHV-7 é fator preocupante, pois a maioria dos soros humanos tem anticorpos para os dois vírus. Estudos utilizando soro hiperimune de ratos mostraram reação cruzada entre os dois vírus sugerindo compartilhamento de epitopos comuns (Tomasi et al., 1994; Ablashi et al., 1998). A infecção por um dos vírus, HHV-6 ou HHV-7, pode induzir a proliferação de clones de células B que produzem anticorpos contra o outro (Ward, 2005).

Estudos relatam que a resposta à terapia antiviral com ganciclovir contra HCMV pode reduzir a carga viral do HHV-6 (Mendez et al., 2001). Por outro lado, o efeito poderia ser indireto causado pelo tratamento ganciclovir da infecção por HCMV (Humar et al., 2006, Mendez et al., 2001). O HCMV pode interagir com outros beta herpes vírus estimulando o HHV-6. Assim, a erradicação do HCMV com o tratamento ganciclovir podem também ser eficaz para o HHV-6.

As frequências de infecções ativas por HHV-6 e HHV-7 antes e depois do tratamento com ganciclovir não foram significativamente diferentes e, não mostraram dados conclusivos para avaliar a eficácia do ganciclovir nestas infecções. O aciclovir pode ter apresentado uma limitada atividade contra o HHV-7 e, isto já foi sugerido por estudo de (Razonable et al., 2002; Drago et al., 2006).

Há poucos relatos na literatura descrevendo HHV-7 após o transplante. No entanto, alguns estudos indicam que a infecção de HHV-7 geralmente precede a de citomegalovírus humano (HCMV) e pode, assim, agravar a doença associada com HCMV ou servir como um marcador de doença HCMV eminente (Yoshikawa et al., 2001).

Vários métodos baseados em PCR quantitativo (R-Time) têm sido desenvolvidos para detectar o HHV-6 em receptores de transplante, sendo assim possível correlacionar a carga viral aos sintomas clínicos (Locatelli et al., 2000; Gautheret-Dejean et al., 2002).

Novas investigações mais aprofundadas sobre o significado clínico de HHV-6 e HHV-7 por antigenemia, sorologia e, prevenção e o tratamento antiviral após transplante de órgãos seriam importantes e muito contribuiriam para o auxílio clínico.

Este foi um trabalho pioneiro com a realização da técnica de antigenemia nesta equipe e até onde se sabe no Brasil, e demonstra, no entanto, que outros estudos são necessários para estabelecer o uso rotineiro de antigenemia para HHV-6 e HHV-7 após o transplante de órgãos.



## **7- CONCLUSÃO**



- Foi possível a padronização e implantação retrospectiva da antigenemia para HHV-6 e HHV-7 e realização da sorologia por método de Elisa do HHV-6 nos receptores de fígado.
  
- HCMV, HHV-6 e HHV-7 foram freqüentemente detectados nos pacientes após o transplante hepático por ambas as técnicas.
  
- A infecção pelos vírus HHV-6 e HHV-7 precederam o HCMV na maioria dos casos e possivelmente induziram o aparecimento de HCMV.
  
- As alterações neurológicas (encefalopatia/encefalite) foram associadas ao HHV-6 isolado e nas co-infecções com o HHV-7.
  
- Foi possível avaliar a concordância entre os resultados obtidos com as técnicas de N-PCR e antigenemia para os beta herpes vírus estudados, embora a antigenemia apresentasse menor sensibilidade do que a N-PCR mas foi mais específica para ambos os vírus.
  
- Os achados clínico-laboratoriais foram corroborados com as infecções detectadas por antigenemia para os beta herpes vírus em muitos casos dos pacientes estudados.







## **8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



Abdel-haq NM, Asmar BI. Human herpes vírus 6 (HHV6) infection. *Indian Pediatr* 2004; 71(1): 89-96.

Abecassis MM, Koffron AJ, Buckingham M, Kaufman DB, Fryer JP, Stuart J, et al. Role of PCR in the Diagnosis and Management of CMV in Solid Organ Recipients. What is the Predictive Value for Development of Disease and Should PCR Be Used to Guide Antiviral Therapy *Transplant Proc* 1997; 29(1-2): 800.

Amorim ML, Cabeda JM, Seca R, Mendes AC, Castro AP, Amorim JM. CMV infection of liver transplant recipients: comparison of antigenemia and molecular biology assays. *BMC Infect Dis* 2001; 1:2.

Angelis M, Cooper J, Freeman RB. Impact of donor infections on outcome of orthotopic liver transplantation 2003; 451-462.

Almeida LNB, Azevedo RS, Amaku M, Massad E. Cytomegalovirus seroepidemiology in an urban community of São Paulo, Brazil. *Rev Saúde Pública* 2001; 35(2): 124-129.

Aquino VH, Figueiredo LTM. Cytomegalovirus Infection in renal Transplant Recipients diagnosed by nested-PCR. *Brazilian Journal of Medical* 2001; 34 (2): 93-101.

Arthurs SK, Eid AJ, Pedersen RA, Dierkhising RA, Kremers WK, Patel R. Delayed-On set Primary Cytomegalovirus Disease After Liver Transplantation 2007; 13:1703-9.

Banffs Schema for Grading Liver Allograft Rejection An International Consensus Document. *Hepatology* 1997; 25 (3):658-63.

Biganzoli P, Ferreyra L, Sicilia P, Carabajal C, Frattari S, Littvik A, et al. IgG Subclasses and DNA Detection of HHV-6 and HHV-7 in Healthy Individuals. *J Med Virol* 2010; 82:1679-83.

Black JB, Pellett PE. Human herpesvirus 7. *Rev Med Virol N.* 9, 1999 p. 245-262.

Black JB, Schwarz TF, Patton JL, Kite-Powell K, Pellett PE, Wiersbitzky S, et al. Evaluation of immunoassays for detection of antibodies to human herpesvirus 7. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996; 3:79-83.

Boeckh WM, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clinic Microbiol Review* 1998; p. 11, p.533-554.

Bonon SHA, Menoni SMF, Rossi CL, Souza CA, Costa SCB. Surveillance of cytoemaglovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation patients. *J Infection* 2005; 50: 130-13.

Bordils A, Plumed JS, Ramos D, Beneyto I, Mascarós V, Molina JM, et al. Comparison of quantitative PCR and antigenemia in cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2005; 37:3756 -9.

Boutolleau DD, Cointe A, Gautheret-Dejean M, Mace H, Agut L, Grangeot-Keros, et al. No evidence for a major risk of roseolovirus vertical transmission during pregnancy. *Clin. Infect* 2003; 36:1634-1635.

Braun DL, Dominguez G, Pellet PE. Human herpesvirus 6. *Clinic Microbiol Review* 1997; 10: 521-56.

Brennan DC. Cytomegalovirus in renal transplantation. *J Am Soc Nephrology* 2001; 12: 848-855.

Bresnahan WA, Shenk T. A Subset of Viral Transcripts Packege Within Human Cytomegalovirus Particles. *Science* 2000; 30:2373: 547.

Brytting M, Sundqvist VA, Stalhandske P, Linde A, Wahren B. Cytomegalovirus DNA detection of an immediate early protein gene with nested primer oligonucleotides. *J Virol Methods* 1991; 32:127-38.

Canada Communicable Disease Report. Expert Working Group on HHV-6 and 7 Laboratory Diagnosis and Testing 2000 (4): 26.

Chantlynne LG, Ablashi DV. Seroepidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV). *Semin Cancer Biol* 1999; (3):175-85.

Chou S Newer Methods for Diagnosis of Cytomegalovirus Infection. *Rev Infect Dis* 1990; (12): 727-735.

Costa FA, Soki MN, Andrade PD, Bonon SHA, Thomasini RL, Sampaio AM, et al. Simultaneous monitoring of CMV and human herpesvirus 6 infections and diseases in liver transplant patients: one-year follow-up. *Clinics* 2011; 66:949-53.

Costa SCB. Infecção por citomegalovirus (CMV); epidemiologia, diagnóstico e tratamento. *Revista Brasileira de Clínica Terapêutica* 1999; p 18-28.

Crumpacker CS, Wadhwa S. Cytomegalovirus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Disease*. 6 ed. Philadelphia: Elsevier Inc. 2005; 1786-96.

Daibata M, Taguchi T, Nemoto Y, Taguchi H, Miyoshi I. Inheritance of Chromosomally Integrated Human Herpesvirus 6 DNA. *Blood* 1999; 94:1545-1549.

De Bolle L, Naesens L, De Clerca E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:217-45.

Deborka D, Durlík M, Sadowska A, Nowacka-Cieciura E, Pazik J, Lewandowski Z, et al. Human Herpesvirus 6 in renal transplant recipients: potential risk factors for the development of human Herpes virus 6 seroconversion. *Transplant Proc* 2003; 35: 2199-2201.

Desachy A, Ranger-Rogez S, François B, Venot C, Traccard I, Gastinne H, et al. Reactivation of HHV-6 in multiple organ failure syndrome. *Clin Infect Dis*. 2001; 32: 197-203.

Dewhurst S, Skrinicosky D, Van loon N. Human Herpes virus 7. Expert review molecular medicine. 1997; 1:1-12.

Dockerll DH. Human herpes virus 6: molecular biology and clinical features. Journal Medic Microbiol 2003; 52: 5-18.

Dockrell DH, Mendez JC, Jones M, Harmsen WS, Ilstrup DM, Smith TF, et al. Human herpes virus 6 seronegativity before transplantation predicts the occurrence of fungal infection in liver transplant recipients. Transplantation. 1999; 67(3):399-403.

Drago F, Aragone MG, Luagni C, Rebora A. Cytomegalovirus infection in normal and immunocompromised humans. Dermatology 2000; 200:189-195.

Drew WL. Diagnosis of cytomegalovirus infection. Rev Infect Dis 1988; 3:468-476.

Ehrnst A. The clinical relevance of different laboratory tests in CMV diagnosis. Scand J Infect Dis Suppl 1996; 100:64-71.

Einsele H, Ehninger G, Hebart H, Wittkowski KM, Schuler U, Jahn G, et al. Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation Blood 1995, 86: 2815-20.

Evans MJ, Edwards-Spring Y, Myers J, Wendt A, Povinelli D, Amsterdam D, et al. Polymerase chain reaction assays for the detection of cytomegalovirus in organ and bone marrow transplant recipients. Immunol Invest 1997; 26 (1-2):209-29.

Feldstein AE, Razonable RR, Boyce TC, Freese DK, El-Youssef M, Perrault J, et al. Prevalence and clinical significance of human herpesviruses 6 and 7 active infection in pediatric liver transplant patients. Pediatr Transplant 2003; 7:125-9.

Ferreira W, Souza J. Microbiologia - volume III. Lidel - edições técnicas, lda; Lisboa, Portugal 2002.

Freeman RB. Risk factors for cytomegalovirus viremia and disease developing after prophylaxis in high-risk solid-organ transplant recipients. *Transplantation* 2004; 78:1765-1773.

Freitas RB, Freitas MR, Oliveira CS, Linhares AC. Human herpesvirus-7 as a cause of exanthematous illnesses in Belem, Para, Brazil. *Rev Inst Med Trop* 2004; 46:139-43.

Freitas RB, Linhares A. Prevalence of hhv-6 antibody in the population of Belém, Pará, northern Brazil. *Transactions of the royal Society of Tropical Medicine and Higiene* 1997; 91: 538-540.

Galarraga MC, Gomez E, de Oña M, Rodrigueus A, Laures A, Boga JA, et al. Influence of Ganciclovir Prophylaxis on Citomegalovirus Human Herpesvirus 6, and Human Herpesvirus 7 Viremia in Renal Transplant Recipients. *Transplant Proc.* 2005; 37:2124-6.

Gentile G. Post-transplant HHV-6 Diseases. *Herpes* 2000; 7(1):24-27.

Gerna G, Percivalle E, Baldanti F, Sozzani S, Lanzarini P, Genin I, et al. Human cytomegalovirus replicates abortively in polymorphonuclear leukocytes after transfer from infected endothelial cells via transient microfusion events. *J Virol* 2000; 74:5629-5638

Gerna G, Zavattoni M, Percivalle E, Zella D, Torsellini M, Revello MG. Diagnosis of human cytomegalovirus infections in th immunocompromised host. *Clin Diagn Virol* 1996; 5(2-3):181-6.

Gautheret-Dejean A, Garbarg-Chenon A, Huraux JM, Agut H. Immune Reactivity of Human Sera to the Glycoprotein B of Human Herpesvirus 7 *J Clin Microbiol* 2002; 51(40):44-51.

Griffiths PD, Ait-khaled M, Bearcroft CP, Clark DA, Guaglia A, Davies CE, et al. Human herpesviruses 6 and 7 as potential pathogen after liver transplant: Prospective comparison with the effect of cytomegalovirus. *J Med Virol* 1999; 59: 496-501.

Griffiths PD, Clark DA, Emery VC. Betaherpesviruses in transplant recipients. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45:29-34.

Gupte M, Diaz-Mitoma F, Feber J, Shaw L, Forget C, Filler G. Tissue HHV6 and HHV7 determination in pediatric solid organ recipients - a pilot study. *Ped Transplantat* 2003; 7: 458-463.

Guardia AC, Stucchi RS, Sampaio AM, Milan A, Costa SC, Pavan CR, et al., Human herpes virus 6 in donor biopsies associated with the incidence of clinical cytomegalovirus disease and hepatitis C virus recurrence. *Int J Infect Dis* 2011; 16:124-9.

Härma M, Hockerstedt K, Krogerus L, Lautenschlager I. Pretransplant human herpes virus 6 infection of patients with acute liver failure is a risk factor for posttransplant human herpes virus 6 infection of the liver. *Transplantation* 2006; 81:367-72.

Härma M, Hockerstedt K, Lautenschlager L. HHV-6 and acute liver failure. *Transplantation* 2003; 76: 536-539.

Hashimoto T, Abe T. Spontaneous regression of primary central nervous system lymphoma: a case report. *No Shinkei Geka* 2004; 32(6):637-42.

Hernando S, Folgueira L, Lumbreras C, Juan San R, Maldonado S, Prieto C, et al. Comparison of cytomegalovirus viral load measure by real-time PCR with pp65 antigenemia for the diagnosis of cytomegalovirus disease in solid organ transplant patients. *Transplantation Proceedings* 2005; 37: 4094-4096.

Ho M. *Cytomegalovirus: Biology and Infection*. Plen Publis Corp. 1991; 1-440.

Hoppe L, Bressane R, Lago LS, Schiavo FL, Mar KL, Castisani CPC. Risk Factors associated with cytomegalovirus-positive antigenemia in orthotopic liver transplant patients. *Transplantation Proceedings* 2004; 36: 961-963.



Humar A, Malkan G, Moussa G, Greig P, Levy G, Mazzulli T. Human herpesvirus-6 is associated with cytomegalovirus reactivation in liver transplant recipients. *J Infect Dis* 2000; 181:1450-3.

Ihira M, Yoshikawa T, Suzuki K, Ohashi M, Suga S, Asonuma K, et al. Correlation between human herpes virus 6 and 7 infections after living related liver transplantation. *Microbiol Immunol* 2001; 45(3):225-32.

Jacobs F, Knoop C, Brancart F, Gilot P, Melot C, Byl B, et al. Brussels Heart and Lung Transplantation Group. Human herpes virus-6 infection after lung and heart-lung transplantation: a prospective longitudinal study. *Transplantation* 2003; 75:1996-2001.

Kas-Deelen AM, The TH, Blom N, Van Der Strate, De Maar EF, Smitt J, et al. Uptake of pp65 in generated pp65-positive polymorphonuclear cells mediated by Phagocytosis and cell fusion *Intervirolgy* 2001, 4 :8- 13.

Kempen JH, Jabs DA, Dunn JP, West SK, Tonascia JA. Retinal detachment risk in cytomegalovirus retinitis related to the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Ophthalmol* 2003; 119: 33-40.

Kochs S, Solana R, Dela Rosa O, Pawelec G. Human cytomegalovirus infection ant T cell immunosescence: a mini review *Mech Ageing Dev* 2006; 127:538-43.

Kotton CN, Humar A, Caliendo AM, Emery V, Lautenschlager I, Lazzarotto T, et al. Transplantation Society International CMV Consensus Group. International consensus gudekines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* 2010; 89:779-95.

Krueger GR, Koch B, Leyssens N, et al. Comparison of seroprevalences of human herpesvirus-6 and -7 in healthy blood donors from nine countries. *Vox Sanguinis* 1998; 75: 193-197.

Lamb D. *Transplante de Órgãos e Ética*. Trad. Jorge Curbelo. São Paulo: Sociedade Brasileira de Vigilância de Medicamentos/Editora Hucitec 2000.

Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther* 2003; 98:269-97.

Lautenschlager I, Halme L, Hockerstedt K, Krogerus L, Taskinen E. Cytomegalovirus infection of the liver transplant: virological, histological, immunological, and clinical observations. *Transpl Infect Dis* 2006; 8:21-30.

Lautenschlager I, Linnavuori K, Lappalainen M, Suni J, Höckerstedt K. HHV-6 reactivation is often associated with CMV infection in liver transplant patients. *Transpl Int* 2000; 131:351-353.

Lautenschlager J, Lappalainen M, Linnavuori K, Suni J, Hockerstedt K. CMV infection is usually associated with concurrent HHV-6 and HHV-7 antigenemia in liver transplant Patients. *J Clin Virol* 2002; 25:57-61.

Leach CT, Pollock BH, McClain KL, Parmley RT, Murphy SB, Jenson HB. HHV-6 and CMV infections in children with human immunodeficiency virus infection and cancer. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21:125-132.

Lee SO, Brown RA, Razonable RR. Clinical significance of pretransplant chromosomally integrated human herpesvirus-6 in liver transplant recipients. *Transplantation* 2011; 92:224-9.

Leong HN, Tuke PW, Tedder RS, Khanom AB, Eglin RP, Atkinson CE, et al. The Prevalence of Chromosomally Integrated Human Herpes virus 6 Genomes in The Blood of uk Blood Donors. *J Med Virol* 2007; 79:45-51.

Levinson W, Jawetz E. *Medical microbiology & immunology: examination & board review* 6th ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill 2000; b p. 206-282. Part. IV.

Levy JA, Landay A, Lennette ET. Human herpes virus 6 inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in cell culture. *Journal Clinical Microbiology* 1990; 28: 2362-2364.

Lianghui G, Shusen Z, Tinoba L, Yan S, Welling W, Anwei L. Deferred versus prophylactic therapy with gancyclovir for cytomegalovirus in allograft liver transplantation. *Transplantation Proceedings* 2004; 36: 1502-1505.

Linares L, Sanclemente G, Cervera C, Hoyo I, Cofán F, Ricart MJ, et al. Influence of Cytomegalovirus Disease in Outcome of Solid Organ Transplant Patients. *Transplantation proceedings* 2011; 43: 2145-2148.

Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definition of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34:1094.

Loginov R, Hārma M, Halme L, Höckerstedt K, Lautenchaler I. HHV-6 DNA In Peripheral Blood Mononuclear Cells After Liver Transplantation. *J Clin Virol* 2006; 1:76-81.

Loginov R, Karlsson T, Höckerstedt K, Ablashi D, Lautenschlager I, et al. Quantitative HHV-6B Antigenemia Test For The Monitoring of Transplant Patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29:881-6.

Locatelli G, Santoro F, Veglia F, Gobbi A, Lusso P, Malnati MS. Real-time quantitative PCR for human herpesvirus 6 DNA. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4042-8.

Lusso P. HHV-6 and the Immune System: Mechanisms Of Immunomodulation and Viral Escape. *J Clin Virol* 2006; 1:S4-10.

Maya TC, Azulay DR. Infecção pelo Citomegalovirus. In: Lupi O; Silva AS; Pereira Jr. Herpes - Clínica, Diagnóstico e Tratamento, 1<sup>o</sup> Ed., Medsi Editora Médica e Científica 2000; 8: 135-156.

Mc Cullers JA, Lakeman FD, Whitley RJ. Human herpes virus 6 is associated With Focal Encephalitis. *Clinical Infectious Disease* 1996; 21:571-576.

Mendez JC, Dockrell MJ, Espy MJ, Smith TF, Wilson JÁ, Harmsen WS, et al. Human  $\beta$ -Herpes virus interactions in solid organ transplant recipients. *The J Infect Dis* 2001; 183:179-84.

Milan A, Sampaio AM, Guardia AC, Pavan CR, Andrade PD, Bonon SH, et al. Monitoring and detection of cytomegalovirus in liver transplant recipients. *Transplant Proc* 2011; 43:1360-1.

Miller CS, Avdiushko SA, Kryscio RJ, Danaher RJ, Jacob RJ. Effect of prophylactic valacyclovir on the presence of Human Herpes virus DNA in saliva of healthy individuals after dental treatment. *J Clin Microbiol.* 2005; 5: 2173-80.

Mirandola P, Menegazzi P, Merighi S, Ravaioli T, Cassai E, Di Luca D. Temporal mapping of transcripts in herpesvirus 6 variants. *J Virol* 1998; 72:3837-44.

Miyake F, Yoshikawa T, Sun H, Kakimi A, Ohashi M. Latent infection of human herpesvirus 7 in CD4+ T lymphocytes. *J Med Virol* 2006; 78:112-116.

Mocarski ES Jr, Abenes GB, Manning WC, Sambucetti LC, Cherrington JM. Molecular genetic analysis of cytomegalovirus gene regulation in growth, persistence and latency. *Curr Top Microbiol Immunol* 1990; 154:47-74.

Mustafa MM. Cytomegalovirus Infection and Disease in the Immunocompromised Host. *The Ped Inf Dis J* 1994; 13:249-259.

Oliveira SA, Turner DJ, Knowles W, Nascimento JP, Brown DW, Ward KN. Primary human herpesvirus-6 and 7 infections, often coinciding, misdiagnosed as measles in children from a tropical region of Brazil. *Epidemiol Infect* 2003; 131:873-879.

Okuno T, Takahashi K, Balachandra K, Shiraki K, Yamanishi K, Takahashi M, et al. Seroepidemiology of human herpes virus 6 infection in normal children and adults. *Journal Clinical Microbiology* 1989; 27: 651-653.

Pannuti CS, Vilas B, Neto LSVA, Ângelo MJO, Sabbada E. Detecção de anticorpos IgM nas interações primárias e secundárias pelo citomegalovirus em pacientes submetidos a transplante renal. *Ver Inst Méd Trop* 1987; 29: 317-322.

Pannutti CS. Citomegalia. In: Ferreira AW, Ávila SLM. eds. Diagnóstico Laboratorial das principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes, 2ª. edição, Editora Guanabara Koogan 2001; Cap. 5, p. 68-73.

Paya CV, Wilson JA, Espy MJ, Sia IG, DeBernardi MJ, Smith TF, et al. Preemptive use of oral ganciclovir to prevent cytomegalovirus infection in liver transplant patients: a randomized, placebo-controlled trial. *J Infect Dis* 2002; 185:854-60.

Peigo MF, Thomasini RL, Puglia AL, Costa SC, Bonon SH, Boin IF, et al. Human Herpesvirus-7 in Brazilian Liver Transplant Recipients. A Follow-UP Comparison Between Molecular and Immunological Assays. *Transplant Infect Dis* 2009; 11:497-502.

Pereira WA. História dos Transplantes. In Pereira WA. Manual de Transplante de Órgãos e Tecidos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 3ª Ed, 2004.

Piiparinen H, Höckerstedt K, Grönhagen-Riska C, Lautenschlager I. Comparison of two quantitative CMV PCR tests, Cobas Amplicor CMV Monitor and TaqMan assay, and pp65-antigenemia assay in the determination of viral loads from peripheral blood of organ transplantpatients. *J Clin Virol* 2004;30:258-66.

Pozo F, Tenório A. Detecção and Typing of Lymphotropic Herpesviruses by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *J of Virol Methods* 1999; 79:9-19.

Raia S, Pinto I, Lopes JD, et al. Transplante de fígado. (Monografia apresentada à Academia Nacional de Medicina.) Rio de Janeiro, 1969.

Ratnamohan VM, Chapman J, Howse H, Bovington K, Robertson P, Byth K, et al. Cytomegalovirus and human herpes virus 6 both cause disease renal transplantation. *Transplantation* 1998; 66: 877-882.

Razonableb RR, Paya CV. Infections and allograft rejection - intertwined complications of organ transplantation. *Swiss Med Wkly* 2005; 135: 39-40.

Razonable RR, Paya C. The impact of HHV-6 and 7 infection on the outcome of liver transplantation. *Liver Transplantation* 2002; (8):651-658.

Razonable RR, Zerr DM. HHV-6, HHV-7 and HHV-8 in Solid organ Transplant Recipients *AM J Transplant* 2009; (4):97-100.

Resch M, Glycoprotein B. (GPUL55) Mediated Morphogenesis of Infectious HCMV Particles. Disponível em [www.biografix.de/HCMV/metaframe/htm](http://www.biografix.de/HCMV/metaframe/htm). acesso em: 10 out 2011.

Ringe B. *AM J Gastroenterol The American Journal of Gastroenterology*. N. 18: 26-89, 1994.

Rowshani AT. Clinical and immunologic aspects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2005 v. 79, n. 4, p. 381-386, Feb.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350-1354.

Sampaio AM, Thomasini RL, Guardia AC, Stucchi RS, Rossi CL, Costa SC, et al. Cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and human herpesvirus-7 in adult liver transplant recipients: diagnosis based on antigenemia. *Transplant Proc* 2011; 43:434:1357-9.

Sampathkumar P, Paya CV. Management of cytomegalovirus infection after liver transplantation. *Liver Transplantation* 2000 v. 6, n. 2, p. 144-156.

Santos RLB. Propriedades Gerais dos Herpes vírus. In: Lupi A, Silva AS, Pereira JR, AC. - *Herpes Clínica, Diagnóstico e Tratamento*, 1ª edição, Medsi Editora Médica e Científica Ltda 2000. Cap 10, p.79-189.

Sashihara J, Tanaka-Taya K, Tanaka S, Amo K, Miyagawa H, Hosoi G, et al. herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients. *Blood* 2002; 100: 2005-11.

Savolainen H, Lautenschlager I, Piiparinen H, Saarinen PU, Hovi L, Vettenranta K. Human Herpesvirus-6 and 7 in Pediatric Stem Cell Transplantation. *Pediatric Blood Cancer* 2005; 45:821-5.

Saxinger C, Polesky H, Eby N, Grufferman S, Murphy R, Tegtmeir G, et al. Antibody reactivity with HBLV (HHV-6) in US populations. *J Virol Methods* 1988; 21: 199-208.

Schafer DF. Liver Transplantation. Looking Back, Looking Forward. Transplantation of the Liver. In: Maddrey CW, Schiff ER, Sorrell MF, Lippincott Williams & Eilke, Philadelphia, 2001.

Schroeder R, Michelon T, Fagundes I, Bortolotto A, Lammerhirt E, Oliveira J, et al. Cytomegalovirus Disease Latent and Active Infection Rates During the First Trimester After Kidney Transplantation. *Transplant Proc* 2004; 36: 896-8.

Scott GM, Naing Z, Pavlovic J, Wasenko JM, Angus P, Jones R, et al. Viral factors influencing the outcome of human cytomegalovirus infection in liver transplant recipients. *J Clin Virol* 2011; 51: 229-33.

Scott GM, Naing Z, Pavlovic J, Iwasenko JM, Angus P, Jones R. Viral Factors Influencing the Outcome of Human Cytomegalovirus Infection in Liver

Sebeková K, Feber J, Carpenter B, Shaw L, Karnauchow T, Diaz-Mitoma F, et al. Tissue Viral DNA is Associated with Chronic Allograft Nephropathy 2005; 95:598-603.

Secchiero P, Zella D, Barabitskaja O, Reitz MS, Capitani S, Gallo RC, et al. Progressive and Persistent Downregulation of Surface CXCR4 in CD4+ T Cells Infected With Human Herpesvirus 7. *Blood* 1998; 92: 4521-4528.

Seehofer D, et al. CMV hepatitis after liver transplantation: incidence, clinical course, and long-term follow-up. *Liver Transplantation*, v.8, n. 12, p. 1138-1146, Dec. 2002.

Shibata D, Martin WJ, Appleman MD, et al. Detection of Cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with Human Immunodeficiency Virus. *J Infect Dis* 1988; 158:1185-1192.

Silva AG. Propriedades Gerais dos Herpes vírus. In: Lupi A, Silva AS, Pereira JR, AC. Herpes Clínica, Diagnóstico e Tratamento: 1ª edição, Medsi Editora Médica e Científica Ltda 2000; Cap 1, p.1-13.

Singh N, Carrigan DR. Human herpes virus-6 in transplantation: an emerging pathogen. *Ann Intern Med* 1996 Jun 15;124 (12):1065-71.

Singh N, Paterson D. Encephalitis Caused By Human Herpes vírus-6 in Transplant Recipients: Relevance of a Novel Neurotropic Virus. *Transplantation* 2000; 69 (12): 2474-79.

Singh N, Wannstedt C, Keyes L, Wagener MM, Vera M, Cacciarelli TV, et al. Impact of Evolving Trends In Recipient And Donor Characteristics on Cytomegalovirus Infection In Liver Transplant recipients. *Transplantation* 2004; 77:106-10.

Smith IL, Cherrington JM, Jiles RE, Fuller MD, Freeman WR, Spector SA. High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *J Infect Dis* 1997; 176(1):69-77.

Snydman DR, Rubin RH, Werner BG. New Developments in cytomegalovirus prevention and management. *Am J Kidney Dis* 1993; 21:217-28.

Starzl TE, Klintmalm GBG, Porter KA, Iwatsuki S, Schroter GP. Liver transplantation with use of cyclosporin-A and prednisone. *N Engl J Med* 1981; 305: 266-9.

Szczepura A, Westmoreland D, Vinogradova Y, Fox J, Clark M. Evaluation of techniques in prediction and diagnosis of cytomegalovirus disease in immunocompromised patients. *Health Technol Assess* 2006; 10: 1-176.



Takahashi Y, Yamada Y, Nakamura J, Tsuzaki T, Padila J, Kitamura T, et al. Transmission of human herpes virus 7 through multigenerational families in the same household. *Pediatr Infect Dis* 1997; 16: 975-978.

Tanaka K, Kondo TT, Torigoe S, Okada S, Mukai T, Yamanishi K. Human herpesvirus 7: another causal agent for roseola (exanthema subitum). *J Pediatr* 1994; 125:1-5.

Tanaka K, Kondo T, Mukai T, Miyoshi H, Yamamoto Y, Okada S, et al. Seroepidemiological study of human herpesvirus-6 and 7 in children of different ages and detection of these two viruses in throat swabs by polymerase chain reaction. *J Med. Virol* 1996; 48:88-94.

Tanaka-Taya K, Sashiara J, Kurahashi H, Amo K, Myagawa H, Kondo K, et al. Human herpes virus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *J Med Virol* 2004; 73:465-473.

Taniguchi T, Shimamoto T, Isegawa Y, Kondo K, Yamanishi K. Structure of Transcripts and Proteins Encoded by U79-80 of Human Herpes virus 6 and Its Subcellular Localization in Infected Cells. *Virology* 2000; 271: 307-320.

Taya K, Terao T, Tanaka T, Sawauchi S, Numoto RT, Murakami S, et al. Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes: a review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. *Transplantation* 1992; 54: 193-198.

Thomasini RL, Sampaio AM, Bonon SH, Boin IF, Leonardi LS, Leonardi M, et al. Detection and monitoring of human herpes virus 7 in adult liver transplant patients: impact on clinical course and association with cytomegalovirus. *Transplant Proc* 2007; 39:1537-9.

Tong CYW, Bakran A, Williams H, Cheung CY, Peiris JSM. Association of human herpes virus 7 with CMV disease in renal transplant recipients. *Transplant*. 2000; 70:213-216.

Tyler KL. Human Herpes vírus 6 and multiple sclerosis: The continuing conundrum. J Infect Dis 2003; 187:1360-1364.

Van Den Berg AP, Klompmaker IJ, Haagsma EB, Scolten-Sampson A, Bijlevel CMA; Schirm J, et al. Antigenemia in the Diagnosis and Monitoring of Active Cytomegalovirus Infection after Liver Transplantation. J Infect Dis 1991; 164: 265-270.

Van der Bij W, Schirm J, Torensma R, van Son WJ, Tegzess AM, The TH. Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. J Clin Microbiol 1988; 26(12):2531-2535.

Viana RAO, Pereira SB, Rocha ALC, Pereira ACM, Oliveira AS. Manifestações Clínicas Associadas ao Herpes vírus Humano Tipo 6, Incluindo Aspectos da Infecção da Imunodeficiência Adquirida. J Brasileiro. 2002; 14:49-53.

Volin L, Lautenschlager I, Juvonen E, Nihtinen A, Anttila VJ, Ruutu T. Human Herpes virus 6 Antigenemia In Allogeneic stem Cell Transplant Recipients: Impact on Clinical Course and Association With Other Beta - Herpes virus. Br J Haematol 2004; 126:690-6.

Ward KN- The natural history and laboratory diagnosis of human herpesvirus-6 and - 7 infections in the immunocompetent. J Clin Virol 2005; 32:183-193.

Ward KN, Andrews NJ, Verity CM, Miller E, Ross EM. Human herpesviruses-6 and -7 each cause significant neurological morbidity in Britain and Ireland. Arch Dis Child 2005; 90 (6): 619-23.

Weigand K, Schnitzler P, Schmidt J, Chahoud F, Gotthardt D, Schemmer P, et al. Cytomegalovirus Infection After Liver Transplantation Incidence, Risks, And Benefits of Prophylaxis. Transplant Proc 2010; 42:2634-41

Weigand K, Schnitzler P, Schmidt J, Chahoud F, Gotthardt D, Schemmer P, et al. Cytomegalovirus Infection After Liver Transplantat Incidence, Risks and Benefits of Prophylaxis. Transplant Proc 2010; 42:2634-41.

Yamanishi K, Okada S. High Incidence of Human herpes virus 6 Infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients 2005; 100-11.

Yoshikawa T, Suga Y, Assano Y, Yazaki T, Kodama H, Ozaki T. Distribution of antibodies to a causative agent of exanthem subitum (human herpes virus-6) in healthy individuals. Pediatrics 1989 84:675-677.

Yoshikawa T. Human herpes virus-6 and -7 infections in transplantation. Pediatric Transplant 2003 Feb;7(1):11-7.





## **9- ANEXOS**



# PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - Unicamp



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 22/07/08.  
(PARECER CEP: Nº 403/2003)

## PARECER

### I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "DETECÇÃO E MONITORIZAÇÃO DA INFECÇÃO ATIVA POR CÍTOMEGALOVÍRUS, HHV-6 E HHV-7 PELA TÉCNICA DE ANTIGENEMIA EM PACIENTES TRANSPLANTADOS HEPÁTICOS".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ana Maria Sampaio

### II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a inclusão do projeto "DIAGNÓSTICO CLÍNICO-LABORATORIAL PARA HERPESVÍRUS HUMANO HCMV, HHV-7 E HHV-8 POR TÉCNICAS IMUNOCITOQUÍMICAS E MOLECULARES EM TRANSPLANTADOS DE FÍGADO" com a finalidade de doutorado, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

### III - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de julho de 2008.

  
*Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo*  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

---

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13084-971 - Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br





## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a colaborar com o projeto de pesquisa **“Herpes vírus Humano HCMV, HHV-6, HHV-7 e HHV-8 no Transplante Hepático: Detecção e Monitorização pela Antigenemia e Nested-PCR”** que será realizado na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. O objetivo desse estudo é avaliar e comparar alguns métodos para detecção da infecção ativa pelos herpes vírus. Serão utilizadas técnicas diferentes para a realização destes diagnósticos e que para isso serão colhidos 12mL de sangue no pré-transplante e no pós-transplante sendo realizadas coletas semanais regulares até completarem 6 meses. Não há riscos previsíveis para esse procedimento. O material biológico obtido será processado e devidamente armazenado no laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular até o final do estudo. Caso haja necessidade de atualização do material em pesquisas futuras aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa, fica a seu critério escolher uma das opções abaixo:

- sim, concordo que o material biológico obtido nesse estudo seja armazenado e utilizado em pesquisa futuras
- não, não desejo que o material biológico obtido nesse estudo seja utilizado em pesquisas futuras

Espera-se que, a partir de resultados obtidos, seja possível o estabelecimento do método mais eficaz que possa auxiliar no diagnóstico precoce da infecção ativa pelos herpes vírus HCMV, HHV-6, HHV-7 e HHV-8, e no tratamento de pacientes transplantados de fígado, portanto, esse estudo não lhe trará benefícios diretos e imediatos. A sua participação na pesquisa não traz complicações legais e a qualquer momento você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento sem que essa decisão lhe traga prejuízos. As informações obtidas serão confidenciais e quaisquer dados serão divulgados

de forma que não possibilite sua identificação, assegurando total privacidade. Não haverá nenhuma forma de reembolso de dinheiro, já que sua participação não lhe trará nenhum gasto. O pesquisador responsável pela pesquisa (identificação abaixo) lhe apresentará o termo e, estando de acordo com o presente documento, você assinará duas vias de igual conteúdo e forma, ficando uma em sua posse. Você tem a garantia de tomar conhecimento e obter informações, a qualquer tempo, dos procedimentos e métodos utilizados neste estudo, bem como dos resultados parciais e finais da pesquisa. Para tanto, você poderá consultar o pesquisador responsável. Outras informações consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP com endereço na Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 Cx Postal 6111, telefone (19) 3751-8936, e e-mail **cep@fcm.unicamp.br**.

---

Pesquisadora Responsável	Paciente
--------------------------	----------

**Ana Maria Sampaio**                      **Nome:** \_\_\_\_\_

**Telefone: (19) 3521-8557**              **R.G.:** \_\_\_\_\_

**E-mail: dra\_ana@fcm.unicamp.br**

**DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS COMPILADOS DOS PACIENTES  
ESTUDADOS DE ACORDO COM A SEMANA DE COLETA**

Sem.	HCMV			HHV-6			HHV-7		Doença			Rejeição	Infecção	Co-infecção			
	Sor.	N-PCR	AGM	Sor.	N-PCR	AGM	N-PCR	AGM	CMV	HHV-6	HHV-7			HHV-6/ HCMV	HHV-7/ HCMV	HHV-7/ HHV-6	HHV-6/ HCMV/ HHV-7
0	28	2	0	5	1	2	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1		1	0		8	6	5	3	0	4	4	0	7	0	0	2	0
2		7	3		10	11	2	3	3	4	0	1	5	2	0	1	0
3		9	2		13	10	2	3	2	4	0	1	8	2	0	1	0
4		10	4	8	10	14	3	4	4	4	0	1	6	3	0	2	0
5		12	7		13	12	1	5	7	6	1	0	8	5	0	2	0
6		12	4		13	9	1	2	4	4	0	1	7	3	0	2	0
7		13	6		14	5	2	0	5	1	1	1	4	0	1	1	0
8		8	2		9	4	0	0	2	2	1	0	3	0	0	0	0
10		7	0		6	7	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
12		6	1	13	4	2	0	0	1	0	0	1	2	0	0	1	0
16		3	3		5	3	1	1	3	1	0	2	4	1	1	1	0
20		2	0		6	2	4	1	1	1	0	3	0	0	0	0	0
24		0	0	15	3	3	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
<b>Total</b>		<b>92</b>	<b>32</b>		<b>115</b>	<b>90</b>	<b>28</b>	<b>23</b>	<b>32</b>	<b>31</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>55</b>	<b>16</b>	<b>2</b>	<b>13</b>	<b>0</b>

Sem.= semana; Sor.= sorologia IgM HHV-6



**MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E ALTERAÇÕES LABORATORIAIS OBSERVADAS NOS PACIENTES  
ATRAVÉS DOS PRONTUÁRIOS**

<b>Paciente</b>	<b>Manifestações clínicas</b>	<b>Alterações laboratoriais</b>	<b>Rejeição/grau</b>	<b>Infecção pós-TXH</b>
1	Assintomático	Não	Não	<i>Staphylococcus aureus</i>
2	Febre, diarreia e pneumonia	↑EH e pancitopenia	Sim/moderada	<i>Candida albicans</i>
3	Febre, ITU e pneumonia	Não	Não	<i>Citrobacter sp</i>
4	Febre, ITU e diarreia	Leucopenia, ↑EH e bilirrubina	Sim/leve	ITU
5	Febre e náuseas	Leucopenia, plaquetopenia ↑EH e bilirrubina	Não	<i>Streptococcus agalactiae</i>
6	Assintomático	Leucopenia, plaquetopenia ↑EH e bilirrubina	Não	Não
7	Insuficiência respiratória	Leucopenia, plaquetopenia ↑EH e bilirrubina	Não	<i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Enterococcus galinarum</i> e <i>Klebsiella sp</i>
8	Sepse, enterorragia e TVP	Leucopenia, plaquetopenia ↑EH e bilirrubina	Sim/moderada	<i>Staphylococcus aureus</i> e Hepatite B aguda
9	Alteração de fala, sepsis, ITU e encefalopatia	Leucopenia, plaquetopenia ↑EH e bilirrubina	Não	ITU
10	Assintomático	Leucopenia, plaquetopenia e ↑EH	Não	<i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Klebsiella sp</i>
11	IRA, derrame pleural	Leucocitose e ↑EH	Não	<i>Candida albicans</i>
12	Febre	↑EH, anemia e plaquetopenia	Não	<i>Streptococcus sp</i>
13	Febre, pneumonia, sintomas meníngeos e encefalite	Leucocitose	Não	<i>P. aeruginosa</i> e <i>Klebsiella sp</i>
14	Febre e pneumonia	↑EH, anemia e plaquetopenia	Não	<i>P. aeruginosa</i> e <i>Klebsiella sp</i>
15	Febre	↑EH, plaquetopenia e leucopenia	Não	<i>Staphylococcus aureus</i>
16	Assintomático	Não	Não	Não
17	Febre, sepsis e cefaléia	↑EH e leucopenia	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>

(Cont.)				
Paciente	Manifestações clínicas	Alterações laboratoriais	Rejeição/grau	Infecção pós-TXH
18	Febre e sepse	↑EH, plaquetopenia e leucopenia	Sim/moderada	<i>Staphylococcus aureus</i>
19	Encefalopatia, convulsão, ITU e sepse	↑EH, plaquetopenia e leucopenia	Sim/leve	levedura
20	Febre, IRA, diarreia, TAH	↑EH, plaquetopenia e leucopenia	Sim/leve	<i>Staphylococcus aureus</i>
21	Assintomático	↑EH, EBV-IGM positivo	Não	<i>Staphylococcus aureus</i>
22	Assintomática	Não	Não	Não
23	Assintomático	↑EH, plaquetopenia e leucopenia	Não	<i>Staphylococcus aureus</i>
24	Assintomática	↑EH, plaquetopenia e leucopenia	Sim/leve	Não
25	Diarréia e febre	↑EH, plaquetopenia e leucopenia	Sim/moderada	<i>Staphylococcus aureus</i>
26	Febre e herpes labial	↑EH, plaquetopenia e leucopenia	Não	<i>Candida albicans</i>
27	Febre, encefalite e pneumonia	↑EH, plaquetopenia e leucopenia	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>Klebsiella sp</i>
28	Diarréia, vômito, cefaléia e tremores	↑EH, plaquetopenia e leucopenia	Não	<i>Staphylococcus aureus</i>
29	Assintomático	↑EH, plaquetopenia e leucopenia	Não	<i>Streptococcus agalactiae</i>
30	Infecção parede abdominal e diarreia	leucocitose	Não	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Klebsiella sp</i>
31	Febre	↑EH, plaquetopenia e leucopenia	Não	Não
32	Assintomática	↑EH, plaquetopenia e leucopenia	Não	Não

**EH=** enzimas hepáticas; **ITU=** infecção de trato urinário; **TVP=** trombose portal; **TAH=** trombose de artéria hepática; **IRA=** insuficiência renal aguda; **P=** Pseudomonas; total de 8 rejeições celulares aguda e 26 episódios de infecção

**NÚMERO DE DOENÇAS CAUSADAS PELOS BETA-HERPES VÍRUS  
ESTUDADOS DE ACORDO COM A SEMANA DE COLETA**

PACIENTE	S1			S2			S3			S4			S5			S6			S7			S8			S10			S12			S16			S20			S24				
	T5	T6	T7	T5	T6	T7	T5	T6	T7	T5	T6	T7	T5	T6	T7	T5	T6	T7	T5	T6	T7	T5	T6	T7	T5	T6	T7	T5	T6	T7	T5	T6	T7	T5	T6	T7	T5	T6	T7		
1	X	X																																							
2													X	X		X	X		X																						
3																											X														
4				X	X			X	X																																
5				X																																					
6																																									
7																																									
8																	X		X				X																		
9								X					X	X																											
10																																									
11											X	X																													
12											X		X			X																									
13	X	X																																							
14															X	X		X					X																		
15																																									
16																																									
17																																									
18											X						X																								
19				X	X																																				
20	X	X									X	X		X	X							X																			
21	X	X															X						X																		
22																																									
23																																									
24																																									
25								X	X		X	X		X	X		X	X																							
26																																									
27								X																																	
28															X	X					X		X		X		X		X												
29																																									
30																																									
31																																									
32																																									

S= SEMANA; T5= HCMV; T6= HHV-6; T7= HHV-7





**DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS DE ACORDO  
COM A SEMANA DE COLETA - DIA 0**

**Anexo 6.1**

Paciente	HCMV				HHV-6				HHV-7			Rejeição	Infecção	CO-INFECÇÃO			
	Sorologia	PCR	AGM	Doença	Sorologia	PCR	AGM	Doença	PCR	AGM	Doença	Celular	Bacteriana	HCMV/ HHV-6	HCMV/ HHV-7	HHV-6/ HHV-7	HCMV/ HHV-6/ HHV-7
1	S	N	N	N	N	N	N	N	S	S	N	N	N	N	N	N	N
2	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
9	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11	S	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
12	S	N	N	N	S	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
13	S	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
14	S	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
16	S	N	N	N	S	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
17	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
18	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
19	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20	S	N	N	N	S	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
21	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
22	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
24	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
25	S	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
26	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
27	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
28	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
29	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
31	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
32	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>Total</b>	28	2	0	0	5	1	2	0	4	1	0	0	0	0	0	0	0

**DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS DE ACORDO  
COM A SEMANA DE COLETA - SEMANA 1**

**Anexo 6.2**

Paciente	HCMV			HHV-6			HHV-7			Rejeição	Infecção	CO-INFECÇÃO					
	Sorologia	PCR	AGM	Doença	Sorologia	PCR	AGM	Doença	PCR	AGM	Doença	Celular	Bacteriana	HCMV/ HHV-6	HCMV/ HHV-7	HHV-6/ HHV-7	HCMV/ HHV-6/ HHV-7
1		N	N	N		N	N	N	S	S	S	N	S	N	N	N	N
2		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4		S	N	N		S	S	S	N	N	N	N	S	N	N	N	N
5		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
9		N	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11		N	N	N		N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
12		N	N	N		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
13		N	N	N		S	S	S	S	S	S	N	S	N	N	S	N
14		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15		N	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
16		N	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
17		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
18		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
19		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20		N	N	N		S	S	S	S	N	S	N	S	N	N	S	N
21		N	N	N		N	N	N	S	S	S	N	S	N	N	N	N
22		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23		N	N	N		S	S	S	N	N	N	N	S	N	N	N	N
24		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
25		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
26		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
27		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
28		N	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
29		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
31		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
32		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>Total</b>	0	1	0	0	0	8	6	4	5	3	4	0	7	0	0	2	0

**DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS DE ACORDO  
COM A SEMANA DE COLETA - SEMANA 2**

**Anexo 6.3**

Paciente	HCMV			HHV-6			HHV-7			Rejeição	Infecção	CO-INFECÇÃO					
	Sorologia	PCR	AGM	Doença	Sorologia	PCR	AGM	Doença	PCR	AGM	Doença	Cellular	Bacteriana	HCMV/ HHV-6	HCMV/ HHV-7	HHV-6/ HHV-7	HCMV/ HHV-6/ HHV-7
1		N	N	N		N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N
2		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
4		S	S	S		S	S	S	N	N	N	N	S	S	N	N	N
5		S	S	S		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6		N	N	N		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
7		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
9		N	N	N		S	S	S	N	N	N	N	S	N	N	N	N
10		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11		S	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
12		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
13		N	N	N		S	S	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N
14		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
16		S	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
17		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
18		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
19		S	S	S		S	S	S	N	N	N	N	S	S	N	N	N
20		N	N	N		S	S	S	N	N	N	S	S	N	N	N	N
21		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
22		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23		N	N	N		N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N
24		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
25		S	N	N		N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
26		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
27		N	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
28		N	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
29		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
31		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
32		S	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>Total</b>	0	7	3	3	0	10	11	4	2	3	0	1	5	2	0	1	0

**DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS DE ACORDO  
COM A SEMANA DE COLETA - SEMANA 3**

**Anexo 6.4**

Paciente	HCMV			HHV-6			HHV-7			Rejeição	Infecção	CO-INFECÇÃO					
	Sorologia	PCR	AGM	Doença	Sorologia	PCR	AGM	Doença	PCR	AGM	Doença	Celular	Bacteriana	HCMV/ HHV-6	HCMV/ HHV-7	HHV-6/ HHV-7	HCMV/ HHV-6/ HHV-7
1		N	N	N		N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N
2		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3		S	N	N		N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
4		S	S	S		S	S	S	N	N	N	S	S	S	N	N	N
5		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6		N	N	N		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
7		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
9		N	N	N		N	S	S	N	N	N	N	S	N	N	N	N
10		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11		S	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
12		N	N	N		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
13		N	N	N		S	S	N	N	S	N	N	N	N	N	S	N
14		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15		N	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
16		S	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
17		N	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
18		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
19		S	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20		N	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
21		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
22		S	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23		S	N	N		S	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N
24		S	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
25		N	S	S		S	S	S	N	N	N	N	S	S	N	N	N
26		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
27		N	N	N		S	S	S	N	N	N	N	S	N	N	N	N
28		S	N	N		S	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
29		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
31		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
32		N	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>Total</b>	0	9	2	2	0	13	10	4	2	3	0	1	8	2	0	1	0

**DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS DE ACORDO  
COM A SEMANA DE COLETA - SEMANA 4**

**Anexo 6.5**

Paciente	HCMV			HHV-6				HHV-7			Rejeição	Infecção	CO-INFECÇÃO				
	Sorologia	PCR	AGM	Doença	Sorologia	PCR	AGM	Doença	PCR	AGM	Doença	Celular	Bacteriana	HCMV/ HHV-6	HCMV/ HHV-7	HHV-6/ HHV-7	HCMV/ HHV-6 /HHV-7
1		N	N	N	S	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N
2		S	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4		S	N	N	N	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6		N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8		N	N	N	S	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
9		N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11		S	S	S	S	S	S	S	N	N	N	N	S	S	N	N	N
12		N	N	N	S	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
13		N	N	N	N	N	S	N	N	S	N	N	N	N	N	S	N
14		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
16		N	N	N	N	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
17		N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
18		S	S	S	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N
19		N	N	N	N	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20		S	N	N	S	S	S	S	N	N	N	N	S	N	N	N	N
21		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
22		N	N	N	S	N	N	N	S	S	N	N	N	N	N	N	N
23		S	N	N	N	N	S	N	N	S	N	N	N	N	N	S	N
24		S	N	N	N	S	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
25		N	S	S	N	S	S	S	N	N	N	N	S	S	N	N	N
26		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
27		S	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
28		S	S	S	N	S	S	S	N	N	N	N	S	S	N	N	N
29		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
30		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
31		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
32		N	N	N	S	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>Total</b>	0	10	4	4	8	10	14	4	3	4	0	1	6	3	0	2	0

**DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS DE ACORDO  
COM A SEMANA DE COLETA - SEMANA 5**

**Anexo 6.6**

Paciente	HCMV			HHV-6			HHV-7			Rejeição	Infecção	CO-INFECÇÃO					
	Sorologia	PCR	AGM	Doença	Sorologia	PCR	AGM	Doença	PCR	AGM	Doença	Celular	Bacteriana	HCMV/ HHV-6	HCMV/ HHV-7	HHV-6/ HHV-7	HCMV/ HHV-6/ HHV-7
1		N	N	N		N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N
2		S	S	S		N	S	S	N	N	N	N	S	S	N	N	N
3		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4		S	N	N		N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
5		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6		N	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8		N	N	N		N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
9		S	S	S		S	S	S	N	N	N	N	S	S	N	N	N
10		S	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11		S	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
12		N	S	S		N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
13		N	N	N		S	S	N	N	S	N	N	N	N	N	S	N
14		N	N	N		N	S	S	N	S	S	N	S	N	N	S	N
15		S	N	N		N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N
16		N	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
17		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
18		S	S	S		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
19		N	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20		S	S	S		S	S	S	N	N	N	N	S	S	N	N	N
21		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
22		N	N	N		N	N	N	S	S	N	N	N	N	N	N	N
23		S	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
24		S	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
25		N	S	S		N	S	S	N	N	N	N	S	S	N	N	N
26		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
27		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
28		S	S	S		S	S	S	N	N	N	N	S	S	N	N	N
29		N	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30		N	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
31		S	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
32		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>Total</b>	0	12	7	7	0	13	12	6	1	5	1	0	8	5	0	2	0

**DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS DE ACORDO  
COM A SEMANA DE COLETA - SEMANA 6**

**Anexo 6.7**

Paciente	HCMV			HHV-6			HHV-7			Rejeição	Infecção	CO-INFECÇÃO					
	Sorologia	PCR	AGM	Doença	Sorologia	PCR	AGM	Doença	PCR	AGM	Doença	Celular	Bacteriana	HCMV/ HHV-6	HCMV/ HHV-7	HHV-6/ HHV-7	HCMV/ HHV-6/ HHV-7
1		N	N	N		S	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N
2		S	S	S		S	S	S	N	N	N	N	S	S	N	N	N
3		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4		S	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6		N	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7		S	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8		N	N	N		S	S	S	N	N	N	N	S	N	N	N	N
9		N	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10		S	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11		N	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
12		S	S	S		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
13		N	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
14		N	N	N		N	S	S	S	N	N	N	S	N	N	S	N
15		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
16		N	N	N		N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
17		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
18		S	S	S		N	S	N	N	N	N	N	S	S	N	N	N
19		S	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20		S	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
21		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
22		N	N	N		N	N	N	N	S	N	S	N	N	N	N	N
23		S	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
24		S	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
25		S	S	S		S	S	S	N	N	N	N	S	S	N	S	N
26		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
27		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
28		S	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
29		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
31		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
32		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>Total</b>	0	12	4	4	0	13	9	4	1	2	0	1	7	3	0	2	0

**DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS DE ACORDO  
COM A SEMANA DE COLETA - SEMANA 7**

**Anexo 6.8**

Paciente	HCMV			HHV-6			HHV-7			Rejeição	Infecção	CO-INFECÇÃO					
	Sorologia	PCR	AGM	Doença	Sorologia	PCR	AGM	Doença	PCR	AGM	Doença	Celular	Bacteriana	HCMV/ HHV-6	HCMV/ HHV-7	HHV-6/ HHV-7	HCMV/ HHV-6/ HHV-7
1		N	N	N		N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N
2		N	S	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4		S	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6		N	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7		S	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8		N	S	S		N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
9		N	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10		S	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
12		S	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
13		N	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
14		N	N	N		S	S	N	S	N	S	N	S	N	N	S	N
15		N	N	N		N	N	N	S	N	N	N	S	N	N	N	N
16		N	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
17		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
18		S	S	S		N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N
19		S	S	S		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20		S	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
21		S	S	S		N	N	S	N	N	N	N	N	N	S	N	N
22		S	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23		S	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
24		S	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
25		S	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
26		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
27		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
28		S	S	S		S	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
29		N	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
31		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
32		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>Total</b>	0	13	6	5	0	14	5	1	2	1	1	1	4	0	1	1	0



**DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS DE ACORDO  
COM A SEMANA DE COLETA - SEMANA 8**

**Anexo 6.9**

Paciente	HCMV			HHV-6			HHV-7			Rejeição	Infecção	CO-INFECÇÃO					
	Sorologia	PCR	AGM	Doença	Sorologia	PCR	AGM	Doença	PCR	AGM	Doença	Celular	Bacteriana	HCMV/ HHV-6	HCMV/ HHV-7	HHV-6/ HHV-7	HCMV/ HHV-6/ HHV-7
1		S	N	N		N	N	N	S	S	S	N	S	N	N	N	N
2		S	S	S		N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
3		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4		S	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6		N	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7		S	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8		N	N	N		S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
9		S	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
11		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
12		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
13		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
14		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15		S	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
16		N	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
17		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
18		S	S	S		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
19		S	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20		N	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
21		N	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
22		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
24		S	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
25		N	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
26		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
27		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
28		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
29		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
31		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
32		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>Total</b>	0	9	2	2	0	9	4	0	1	1	1	0	4	0	0	0	0

**DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS DE ACORDO  
COM A SEMANA DE COLETA - SEMANA 10**

**Anexo 6.10**

Paciente	HCMV			HHV-6			HHV-7			Rejeição	Infecção	CO-INFECÇÃO					
	Sorologia	PCR	AGM	Doença	Sorologia	PCR	AGM	Doença	PCR	AGM	Doença	Celular	Bacteriana	HCMV/ HHV-6	HCMV/ HHV-7	HHV-6/ HHV-7	HCMV/ HHV-6/ HHV-7
1		S	N	N		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
2		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4		N	N	N		N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5		S	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7		N	N	N		S	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
8		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
9		S	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10		S	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
12		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
13		N	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
14		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15		S	N	N		N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
16		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
17		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
18		S	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
19		N	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20		S	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
21		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
22		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
24		N	N	N		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
25		S	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
26		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
27		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
28		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
29		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
31		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
32		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>Total</b>	0	8	0	0	0	6	7	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0

**DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS DE ACORDO  
COM A SEMANA DE COLETA - SEMANA 12**

**Anexo 6.11**

Paciente	HCMV			HHV-6			HHV-7			Rejeição	Infecção	CO-INFECÇÃO					
	Sorologia	PCR	AGM	Doença	Sorologia	PCR	AGM	Doença	PCR	AGM	Doença	Celular	Bacteriana	HCMV/ HHV-6	HCMV/ HHV-7	HHV-6/ HHV-7	HCMV/ HHV-6/ HHV-7
1		S	N	N	S	N	S	N	S	N	N	N	N	N	N	S	N
2		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3		S	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
4		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
8		S	N	N	S	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
9		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10		S	N	N	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
12		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
13		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
14		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
16		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
17		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
18		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
19		N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20		N	N	N	S	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
21		S	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
22		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
24		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
25		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N
26		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
27		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
28		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
29		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
31		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
32		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>Total</b>	0	7	1	1	13	4	3	0	1	0	0	1	2	0	0	1	0

**DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS DE ACORDO  
COM A SEMANA DE COLETA - SEMANA 16**

**Anexo 6.12**

Paciente	HCMV			HHV-6			HHV-7			Rejeição	Infecção	CO-INFECÇÃO					
	Sorologia	PCR	AGM	Doença	Sorologia	PCR	AGM	Doença	PCR	AGM	Doença	Celular	Bacteriana	HCMV/ HHV-6	HCMV/ HHV-7	HHV-6/ HHV-7	HCMV/ HHV-6/ HHV-7
1		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4		N	S	S		N	N	N	S	N	N	S	S	N	S	N	N
5		S	S	S		N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
6		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8		S	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
9		N	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
12		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
13		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
14		S	S	S		S	S	S	N	N	N	N	S	S	N	N	N
15		N	N	N		S	S	N	N	S	N	N	N	N	N	S	N
16		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
17		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
18		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
19		N	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20		N	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
21		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
22		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
24		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
25		N	N	N		N	N	N	N	N	N	S	S	N	N	N	N
26		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
27		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
28		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
29		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
31		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
32		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>Total</b>	0	3	3	3	0	5	3	1	1	1	0	2	4	1	1	1	0

**DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS DE ACORDO  
COM A SEMANA DE COLETA - SEMANA 20**

**Anexo 6.13**

Paciente	HCMV			HHV-6			HHV-7			Rejeição	Infecção	CO-INFECÇÃO					
	Sorologia	PCR	AGM	Doença	Sorologia	PCR	AGM	Doença	PCR	AGM	Doença	Celular	Bacteriana	HCMV/ HHV-6	HCMV/ HHV-7	HHV-6/ HHV-7	HCMV/ HHV-6/ HHV-7
1		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2		N	N	N		N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N
3		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5		S	N	N		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
6		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8		S	N	N		S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N
9		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11		N	N	N		S	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
12		N	N	N		S	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
13		N	N	N		S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
14		N	N	N		N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15		N	N	S		N	N	S	N	S	N	N	N	N	N	N	N
16		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
17		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
18		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
19		N	N	N		S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N
20		N	N	N		S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
21		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
22		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23		N	N	N		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
24		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
25		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
26		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
27		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
28		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
29		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
31		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
32		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>Total</b>	0	2	0	1	0	6	2	1	4	1	0	3	0	0	0	0	0

**DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS DE ACORDO  
COM A SEMANA DE COLETA - SEMANA 24**

**Anexo 6.14**

Paciente	HCMV			HHV-6			HHV-7			Rejeição	Infecção	CO-INFECÇÃO					
	Sorologia	PCR	AGM	Doença	Sorologia	PCR	AGM	Doença	PCR	AGM	Doença	Celular	Bacteriana	HCMV/ HHV-6	HCMV/ HHV-7	HHV-6/ HHV-7	HCMV/ HHV-6/ HHV-7
1		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
2		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N
3		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
4		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
5		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
8		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
9		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
11		N	N	N	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
12		N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
13		N	N	N	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
14		N	N	N	S	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N
15		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
16		N	N	N	S	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
17		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
18		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
19		N	N	N	S	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20		N	N	N	S	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
21		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
22		N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
24		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N
25		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
26		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
27		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
28		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
29		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
31		N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
32		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>Total</b>	0	0	0	0	15	3	3	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0



## Cytomegalovirus, Human Herpesvirus-6, and Human Herpesvirus-7 in Adult Liver Transplant Recipients: Diagnosis Based on Antigenemia

A.M. Sampaio, R.L. Thomasini, A.C. Guardia, R.S.B. Stucchi, C.L. Rossi, S.C.B. Costa, and I.F.S.F. Boin

### ABSTRACT

Human herpesvirus (HHV)-6, HHV-7, and cytomegalovirus (CMV) that remain latent after primary infection can be reactivated during immunosuppression following organ transplantation in liver transplant recipients. The aim of this study was to monitor active infections for HHV-6, HHV-7, and CMV among adult liver transplantation recipients using antigenemia detected by an immunoperoxidase staining. Twenty-eight adult liver transplant patients were monitored using antigenemia in blood samples obtained at the time of transplantation, as well as weekly in the first month and once a month for 6 months. Of these patients, 28.5% showed positive CMV antigenemia; 39.2%, HHV-6 antigenemia; and 14.2%, HHV-7 antigenemia. The detection of the three viruses was considered to be independent of one another ( $P > .05$ ). The results described above showed that few patients remain free of beta herpesviruses after liver transplantation. Most patients were infected sequentially and not concurrently. Antigenemia has been considered useful to detect active HHV-6 and HHV-7 infections. Antigenemia can be more efficiently interpreted when compared with polymerase chain reaction results, although other studies are necessary to establish the reference of HHV-6 and HHV-7 antigenemia.

**C**YTOMEGALOVIRUS (CMV), Human Herpesvirus (HHV 6) and HHV-7 are DNA viruseal members of the betaherpesvirinae subfamily of the Betaherpesviridae. Betaherpesviruses, that remain latent after primary infection can be reactivated during immunosuppression following organ transplantation.<sup>1</sup> Active CMV infection is known as a major infectious complication after transplantation. HHV-6 has been related to graft dysfunction, bone marrow suppression, and predisposition to CMV disease, but specific aspects of HHV-7 remain poorly studied with unknown clinical significance.<sup>1,2</sup>

Only a few studies concerning HHV-6 and HHV-7 antigenemia have been published compared with CMV. Although the diagnosis of significant HHV-6 and HHV-7 active infections is under investigation, HHV-6 and HHV-7 antigenemia may be more efficient to discriminate between latent and active infections compared with polymerase chain reaction (PCR). The aim of this study was to monitor active CMV, HHV-6, and HHV-7 infections in adult liver transplant recipients using antigenemia techniques.

### MATERIALS AND METHODS

This observational, analytic, cohort and prospective study of 35 potential liver transplant recipients between 2004 to 2006 included 28 (19 men and 9 women) subjects of overall average age of 45 years who fulfilled our inclusion criteria. The patients who died before

the first month after surgery or had interruption in blood sample collection were excluded from this study.

All patients received prophylaxis for *Herpes simplex* infection.<sup>3</sup> EDTA treated peripheral blood was obtained from patients at the time of transplantation, as well as weekly for the first month and once a month for 180 days.

The protocol was designed in accordance with the requirements for research involving human subjects in Brazil, and approved by the Institutional Ethics Committee (No. 430/2003). CMV antigenemia was performed according to Van der Ploeg et al (1992) and HHV-6 and-7 antigenemia according to Lautenschlager (2002) with some modifications.<sup>4,5</sup>

### RESULTS

CMV antigens were detected in neutrophil nuclei and HHV-6 and HHV-7 in lymphocyte cytoplasm (Fig 1). CMV active infection was observed in 8/28 (28.5%) patients at a

From the Department of Medical Science (A.M.S., R.L.T., A.C.G.), Unit of Liver Transplantation (R.S.B.S., I.d.F.S.F.B.), Clinical Pathology Department (C.L.R.), and Internal Medicine Department-Diagnosis of Molecular Infection Diseases (S.C.B.C.), University of Campinas, Campinas, Brazil.

Address reprint requests to Ilka Boin, Rua Aldo Oliveira Barbosa 184, Campinas-SP, Brazil, CEP 13086-030. E-mail: [ilkaboin@yahoo.com](mailto:ilkaboin@yahoo.com)

median time to first detection of 28.5 days (range = 0–302). HHV-6 active infection was detected in 11/28 (39.2%) patients with a median time to first detection of 9 days (range = 0–37). HHV-7 active infection was noted in 4/28 (14.2%) patients, at a median time to first detection of 16 days (range = 0–33).

Coinfections by CMV/HHV-6, CMV/HHV-7, and HHV6/HHV-7 occurred in 4 (14.2%), 0 (0%), and 1 (3.6%) patient, respectively. No patient had coinfection of the three viruses at the same time.

## DISCUSSION

Several data have demonstrated the importance of CMV in the posttransplant course largely based upon antigenemia alone or associated with PCR tests. Among adult transplant patients, HHV-6 and HHV-7 reactivations are frequently demonstrated by PCR in kidney and liver transplantation cases in association with CMV.<sup>6</sup>

Among other clinical aspects, HHV-6 may cause graft dysfunction in liver transplant patients.<sup>7</sup> However, HHV-6 active infections in immunosuppressed patients are not completely clear and HHV-7 has been occasionally studied. CMV-associated syndromes, such as fever or graft dysfunction, may thus be caused by one or another of these viruses.<sup>6</sup>

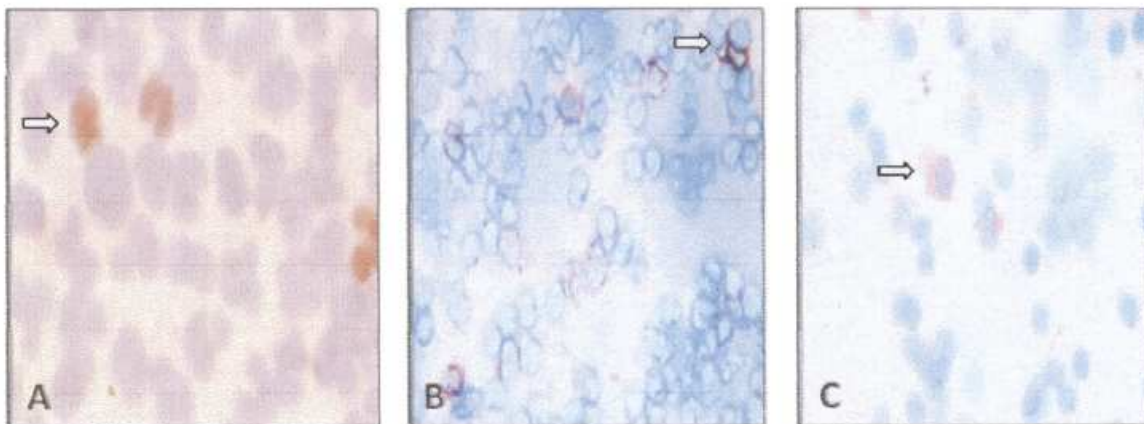
In this study, we demonstrated the appearance of CMV, HHV-6, and HHV-7 antigenemia in the liver transplantation recipients. CMV, HHV-6, or HHV-7 was detected in 28%, 39%, or 14% of the patients, respectively. According to other studies, CMV, HHV-6 or HHV-7 active infection can be diagnosed based on antigen detection in peripheral blood leukocytes from liver transplant patients by antigenemia (an immunocytochemical assay). Recent studies, have shown high prevalences of this virus after liver transplantation.<sup>3,8</sup> CMV antigens are currently detected in neutrophil nuclei while detection of HHV-6 and HHV-7 antigens

occurs mainly in the cytoplasm of lymphocytes, due to the biological replication characteristics of these viruses.

The antigenemia test is quite similar to that for CMV pp65 antigenemia, which is also used to diagnose active CMV infection in blood samples.<sup>9</sup> These two tests in parallel are helpful to diagnoses HHV-6 and CMV infections after liver transplantation.

Eight of 28 patients (28%) developed high levels of CMVpp65 antigenemia during the first months after transplantation (median = 28 days). The incidence of HHV-6 antigenemia was detected in 11/28 of subjects initially at 9 days. HHV-7 antigenemia was detected in 14% of patients at 16 days after transplantation. Our results as well as those previously reported showed that HHV-6 appears before CMV in most cases. HHV-6 and HHV-7 antigenemia usually occurred together with symptomatic CMV infection after liver transplantation. HHV-6 preceded CMV, but HHV-7 appeared together with CMV.<sup>6</sup> Antigenemia may be considered a technique that is faster and easier to perform, requiring little equipment; it is relatively easy to interpret. However, antigenemia always requires fresh blood samples and cells previously fixed onto slides that can be frozen until testing. Detection of viral antigens indicates that there is viral replication inside the cells. It may be more efficient to discriminate between latent and active infections. Thus, positive cells can be counted and a pattern of significance level established. However, other studies are necessary to know the real significance of viral replication detected by antigenemia, whereas clinical aspects of HHV-6 and HHV-7 are not completely clear. Another advantage of antigenemia is that the use of immunoperoxidase staining does not require a fluorescence microscope. However, other studies are necessary to establish the use of HHV-6 and HHV-7 antigenemia routinely after liver transplantation.

In conclusion, CMV, HHV-6, and HHV-7 were fre-



**Fig 1.** (A) Nuclei of the neutrophils exhibiting positive cytomegalovirus antigenemia (arrow) stained in brown. Mononuclear cell cytoplasm exhibiting positive human herpesvirus-6 (B) and human herpesvirus-7 (C) antigenemia stained in brown (magnification 400 $\times$ ). All preparations were counterstained with Harris's hematoxylin.



quently detected in among adult liver transplant patients by antigenemia; coinfection was generally not found. This study supported the view that antigenemia may be useful to detect and monitor HHV-6 and HHV-7 active infections in liver transplant recipients.

#### REFERENCES

1. Tong CYW, Barkran A, Willians, et al: Association of human herpesvirus 7 with cytomegalovirus disease in renal transplant recipients. *Transplantation* 70:213, 2000
2. Ihira M, Yoshikaw T, Suzuki K, et al: Correlation between human herpesvirus 6 and 7 infections after living related liver transplantation. *Microbiol Immunol* 45:225, 2001
3. Thomasini RL, Sampaio AM, Bonon SH, et al: Detection and monitoring of human herpesvirus 7 in adult liver transplant patients: impact on clinical course and association with cytomegalovirus. *Transplant Proc* 39:1537, 2007
4. Van Der Ploeg M, Van Der Berg Ap, Vlieger AM, et al: Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes. A review of antigenemia assay and polimerase chain reaction. *Transplantation* 54:193, 1992
5. Lautenschlager J, Lappalainen M, Linnavuori K, et al: CMV infection is usually associated with concurrent HHV-6 and HHV-7 antigenemia in liver transplant Patients. *J Clin Virol* 25:57, 2002
6. Razonable RR, Paya CV: The impact of human herpesvirus-6 and -7 infection on the outcome of liver transplantation. *Liver Transpl* 8:651, 2002
7. Lautenschlager I, Höckerstedt K, Linnavuori K, et al: Human herpesvirus-6 infection after liver transplantation. *Clin Infect Dis* 26:702, 1998
8. Härmä M, Höckerstedt K, Lyytikäinen O, et al: HHV-6 and HHV-7 antigenemia related to CMV infection after liver transplantation. *J Med Virol* 78:800, 2006
9. Kim JM, Kim SJ, Joh JW, et al: The risk factors for cytomegalovirus syndrome and tissue-invasive cytomegalovirus disease in liver transplant recipients who have cytomegalovirus antigenemia. *Transplant Proc* 42:890, 2010