



ANA CAROLINA GUARDIA DA SILVA

AVALIAÇÃO DA CINÉTICA VIRAL DO HERPESVIRUS
HUMANO 6 E CITOMEGALOVIRUS POR PCR EM TEMPO
REAL E DAS COMPLICAÇÕES CLÍNICAS RELACIONADAS
OCORRIDAS APÓS O TRANSPLANTE DE FÍGADO

CAMPINAS
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

Ana Carolina Guardia da Silva

**AVALIAÇÃO DA CINÉTICA VIRAL DO HERPESVIRUS HUMANO 6 E
CITOMEGALOVIRUS POR PCR EM TEMPO REAL E DAS
COMPLICAÇÕES CLÍNICAS RELACIONADAS OCORRIDAS APÓS O
TRANSPLANTE DE FÍGADO**

Orientadora: Profa. Dra. Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin

Co-orientadora: Profa. Dra. Raquel Silveira Bello Stucchi

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção do título de Doutora em Ciências.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA ANA CAROLINA GUARDIA DA SILVA E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ILKA DE FATIMA SANTANA FERREIRA BOIN

Assinatura do(a) Orientador(a)

Campinas
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Manstella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Si38a Silva, Ana Carolina Guardia da, 1980-
Avaliação da cinética viral do Herpesvirus Humano 6 e Citomegalovirus por PCR em tempo real e das complicações clínicas relacionadas ocorridas após o transplante de fígado / Ana Carolina Guardia da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Ilka de Fatima Santana Ferreira Boin.

Coorientador: Raquel Silveira Bello Stucchi.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Herpesvirus Humano 6. 2. Citomegalovirus. 3. Transplante de fígado. I. Boin, Ilka de Fatima Santana Ferreira, 1953-. II. Stucchi, Raquel Silveira Bello, 1958-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of viral kinetics of Human Herpesvirus 6 and Cytomegalovirus by real time PCR and related clinical complications occurring after liver transplantation

Palavras-chave em inglês:

Human Herpesvirus 6

Cytomegalovirus

Liver transplantation

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Títuloção: Doutora em Ciências da Cirurgia

Banca examinadora:

Ilka de Fatima Santana Ferreira Boin [Orientador]

Estela Regina Ramos Figueira

Renato Ferreira da Silva

Jazon Romilson de Souza Almeida

Elaine Cristina de Ataíde

Data de defesa: 13-12-2013

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

ANA CAROLINA GUARDIA DA SILVA

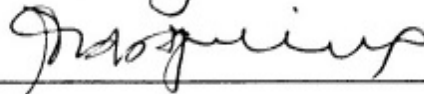
Orientadora PROFA. DRA. ILKA DE FÁTIMA SANTANA FERREIRA BOIN

MEMBROS:

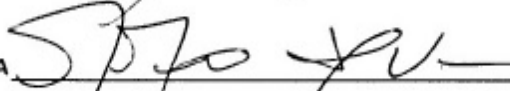
1. PROFA. DRA. ILKA DE FÁTIMA SANTANA FERREIRA BOIN



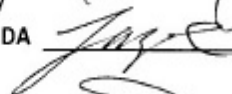
2. PROFA. DRA. ESTELA REGINA RAMOS FIGUEIRA



3. PROF. DR. RENATO FERREIRA DA SILVA



4. PROF.DR. JAZON ROMILSON DE SOUZA ALMEIDA



5. PROFA.DRA. ELAINE CRISTINA DE ATAIDE



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

Data: 13 de dezembro de 2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais José Geraldo e Maria Beatriz, que me amam e se privam dos
próprios ideais para concretizar os meus sonhos.

Aos meus irmãos Luiz Gustavo e Juliana pelo companheirismo e incentivo ao longo
desse projeto.

A todos os meus familiares e amigos que compartilham todos os momentos
mostrando a verdadeira amizade, amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo privilegio da vida.

Aos meus pais e irmãos por sempre estarem presentes na minha vida.

A minha orientadora, Profa. Dra. Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin, por me ensinar, apoiar, por muitas vezes ser mãe, amiga, meus sinceros agradecimentos por toda confiança, oportunidade e paciência.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Raquel Silveira Bello Stucchi, pela confiança, amizade e incentivo. Pelos conselhos e valorização deste estudo, serei eternamente grata.

Em especial aos pacientes, por terem aceitado participar deste estudo, aos familiares dos doadores, pela permissão da doação.

A Joseane Morare, aluna e funcionária do laboratório de sinalização celular do Gastrocentro - Unicamp, que me muito me ajudou com a realização dos PCR real time, e a todos os alunos do laboratório que colaboraram.

Ao Prof. Dr. Licio Augusto Velloso por disponibilizar o laboratório de sinalização celular para realização dos testes.

À equipe da Unidade de Transplante de Fígado da Unicamp, obrigada pela acolhida e amizade, a médica e cirurgiã Dra. Elaine Cristina de Ataíde, as enfermeiras Elizabete e Fátima, a assistente social Cristina, as psicólogas Ana Maria e Maria Izabel, a fisioterapeuta Aurea e a querida Deuza.

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

À equipe do Laboratório Hepatologia e Bacteriologia do Gastrocentro, Nanci Nishimura, Natalicia Hara e Elizabete Gonçalves por sempre me ajudar, pela paciência, pelo carinho e pela amizade.

A Célia Pavan que muito nos ajudou nas coletas ambulatoriais.

A querida amiga e companheira Arlete Milan por estar sempre ao meu lado batalhando por este estudo.

A Ana Maria pelas coletas.

Aos alunos de pós-graduação Paula J. Lopes, Thays S. Guerra e Ivan Campos pela amizade, companheirismo e ajuda sempre que necessário.

Aos alunos de iniciação científica Renan Colombari e Gabriel Magalhães que contribuíram na coleta de informações sobre os pacientes.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma, meus sinceros agradecimentos.

Que eu continue a acreditar no outro mesmo sabendo de alguns valores tão esquisitos que permeiam o mundo; Que eu continue otimista, mesmo sabendo que o futuro que nos esperam nem sempre é tão alegre; Que eu continue com a vontade de viver, mesmo sabendo que a vida é, em muitos momentos, uma lição difícil de ser aprendida; Que eu permaneça com a vontade de ter grandes amigos (as), mesmo sabendo que com as voltas do mundo, eles (as) vão indo embora de nossas vidas; Que eu realmente sempre a vontade de ajudar as pessoas, mesmo sabendo que muitas delas são incapazes de ver, sentir, entender ou utilizar esta ajuda; Que eu mantenha meu equilíbrio, mesmo sabendo que os desafios são inúmeros ao longo do caminho; Que eu exteriorize a vontade de amar, entendendo que amar não é sentimento de posse, é sentimento de doação; Que eu sustente a luz e o brilho no olhar, mesmo sabendo que muitas coisas que vejo no mundo, escurecem meus olhos; Que eu retroalimente minha garra, mesmo sabendo que a derrota e a perda são ingredientes tão fortes quanto o sucesso e a alegria; Que eu atenda sempre mais à minha intuição, que sinaliza o que de mais autêntico possuo; Que eu pratique sempre mais o sentimento de justiça, mesmo em meio à turbulência dos interesses; Que eu não perca o meu forte abraço, e o distribua sempre; Que eu perpetue a beleza e o brilho de ver, mesmo sabendo que as lágrimas também brotam dos meus olhos; Que eu manifeste o amor por minha família, mesmo sabendo que ela muitas vezes me exige muito para manter sua harmonia; Que eu acalente a vontade de ser grande, mesmo sabendo que minha parcela de contribuição no mundo é pequena; E, acima de tudo... Que eu lembre sempre que todos nós fazemos parte desta maravilhosa teia chamada vida, criada por alguém bem superior a todos nós! E que as grandes mudanças não ocorrem por grandes feitos de alguns e, sim, nas pequenas parcelas cotidianas de todos nós!

Chico Xavier

RESUMO

RESUMO

Introdução: As infecções oportunistas constituem um dos principais problemas para os transplantados de fígado. O Citomegalovírus (CMV) e o Herpesvirus humano 6 (HHV-6) são patógenos oportunistas freqüentes nesses pacientes, e o HHV-6 tem sido associado a várias desordens tais como a encefalite. A PCR em tempo real (RT-PCR) é o padrão ouro de diagnóstico para os herpesvirus, pois tem melhor precisão, maior rendimento e menos risco de contaminação em comparação com outros testes convencionais. Objetivo: Este estudo teve como objetivo avaliar a cinética viral do HHV-6 e CMV por RT-PCR nos pacientes submetidos ao transplante hepático correlacionando-a com a presença de encefalite e complicações clínicas ocorridas no período pós-transplante. Método: Foram analisadas prospectivamente pela RT-PCR a carga viral do CMV e HHV-6 de 30 pacientes transplantados de fígado. A monitorização dos pacientes foi realizada prospectivamente desde o pré-transplante (imediatamente antes do ato cirúrgico - dia zero) com amostras do doador e receptor, e no pós-transplante: 2^a, 3^a, 4^a, 6^a, 8^a, 10^a e 12^a semanas, somando 270 amostras de soro. O protocolo foi seguido de acordo com os requerimentos para pesquisas e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisada da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (CEP nº 430/2003). Os achados clínicos foram obtidos através dos prontuários. Para a detecção e quantificação do DNA dos vírus CMV e HHV-6 foram usados os Kits comerciais “CMV Real-TM Quant” e “HHV-6 Real-TM Quant”. Os testes de Nested-PCR e antigenemia foram realizados rotineiramente para o vírus CMV, pelos laboratórios do HC-Unicamp, e seu resultados obtidos eletronicamente. A análise estatística comparou as variáveis categóricas usando o teste exato de Fisher. Para identificar os fatores associados ao aumento da carga viral foi utilizado o método das Equações de Estimção Generalizadas e medidas de acurácia. Resultados: Treze (43%) dos 30 pacientes apresentaram infecção pelo HHV-6 e 26 (86%) apresentaram infecção pelo CMV. Nove pacientes apresentaram encefalite após o transplante de fígado sendo que sete deles tiveram infecção pelo HHV-6 ($p=0,0012$), assim com o aumento da carga viral do HHV-6 se constatou a presença de encefalite após o transplante de fígado ($p= 0.0226$). O RT-PCR ($p= 0,0306$) para o CMV mostrou aumento significativo na segunda a quarta semana e décima a décima segunda semanas em relação aos outros testes, mostrando-se também mais

sensível. Conclusão: concluímos que o aumento da carga viral do HHV-6 foi associado com a presença de encefalite após o transplante de fígado e a técnica de PCR em tempo real se mostrou como o teste mais sensível para detecção e monitorização do CMV nos pacientes transplantados de fígado.

ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction: Opportunistic infections are a major problem for liver transplantation patients. Cytomegalovirus (CMV) and human herpesvirus 6 (HHV-6) are opportunistic common pathogens and HHV-6 has been associated with several disorders such as encephalitis. Real-time PCR (RT-PCR) is the gold standard for diagnosis of herpesvirus, as it has better accuracy, higher efficiency and less risk of contamination compared to other conventional tests. Objective: The aim of study was to evaluate the viral kinetics of HHV-6 and CMV by RT-PCR in patients undergoing liver transplantation and correlated with the presence of encephalitis complications occurring in the post-transplant period. Methods: We prospectively analyzed by RT-PCR the viral load of CMV and HHV-6 in 30 liver transplant patients. Monitoring of patients was performed prospectively from pretransplant (immediately before surgery-day zero) with donor and recipient samples and posttransplant: 2nd, 3rd, 4th, 6th, 8th, 10th and 12th weeks with a total of 270 serum samples. The protocol was followed according to the requirements for research and was approved by the Ethics Research Committee of the Faculty of Medical Sciences State University of Campinas (CEP n° 430/2003). The clinical findings were obtained from the medical records. For detection and quantification of DNA of the CMV and HHV-6 virus the commercial kits "Real- CMV Quant TM" and "HHV-6 Real -TM Quant" were used. Nested-PCR and antigenemia tests were performed routinely for CMV virus and their results obtained electronically. Statistical analysis comparing categorical variables was applied using Fisher exact test. To identify associated factors with increased viral load the method of Generalized Estimation Equation (GEE) and the accuracy and precision was used. Results: Thirteen (43 %) of the thirty patients had HHV-6; 26 (86 %) had CMV infection. Nine patients had encephalitis after liver transplantation and seven of them had HHV-6 ($p = 0.0012$) and with an increasing viral load of HHV-6 the presence of encephalitis after liver transplantation was found ($p = 0.0226$). RT-PCR ($P = 0.0306$) CMV showed a significant increase at the 2nd to 4th week and 10th to 12th week compared to the other tests, having also more sensibility. Conclusion: We concluded that the increase in viral load of HHV-6 was associated with the presence of encephalitis after liver transplantation and the

technique of real-time PCR was shown to be the best sensibility test for the detection and monitoring of CMV in our liver transplant patient

Abstract

xx

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
AVC	Acidente vascular cerebral
AGM	Antigenemia
ALT	Alanina-amino-transferase
CIHH-6	Cromossomo integrado ao Herpesvirus Humano Tipo 6
CMV	Citomegalovírus
Ct	Threshold cycle
DNA	Ácido desoxirribonucléico ou ADN
EEG	Equação de Estimação Generalizada
EBV/HHV-4	Epstein-Barr Vírus
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay ou Ensaio Imunoenzimático
FAF	Falência aguda do fígado
g	Unidade de Gravidade
gB	Glicoproteínas do envelope
VHC	Vírus da Hepatite C
HHV-1	Herpes simplex Tipo 1
HHV-2	Herpes simplex Tipo 2
HHV-3	Herpes Zoster
HHV-6	Herpesvirus Humano Tipo 6
HHV-7	Herpesvirus Humano Tipo 7
HHV-8	Herpesvirus Humano Tipo 8
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IgG	Imunoglobulinas da classe G
IgM	Imunoglobulinas da classe M
IMC	Índice de massa corporal
Log	logaritmo

LISTA DE ABREVIATURAS

M	Molar
ml	Mililitros
mM	Milimolar
Nested-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase dupla
nm	Nanômetro
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pmol	Picomoles
pp65	Proteína matricial de peso molecular 65
RPM	Rotação por minuto
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
TCE	Trauma crânio encefálico
TOF	Transplante ortotópico de fígado
UTH	Unidade de Transplante Hepático
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
µl	Microlitros
Kg	Quilograma

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tabela 1: Ciclos de amplificação do HHV-6 pela PCR em tempo real.	50
Tabela 2	Tabela 2: Ciclos de amplificação do CMV pela PCR em tempo real.	51
Tabela 3	Tabela 3: Características dos doadores	61
Tabela 4	Tabela 4: Positividade da infecção pelo HHV-6 de acordo com as semanas estudadas	63
Tabela 5	Tabela 5: Resultados das Equações de Estimação Generalizadas (EEG) para estudo da relação entre as variáveis de interesse e a carga viral HHV-6 ao longo das avaliações.	64
Tabela 6	Tabela 6: Medidas de acurácia, sensibilidade, especificidade, valores preditivo positivo e negativo dos testes para CMV em relação à doença do CMV.	66
Tabela 7	Tabela 7: Resultados das Equações de Estimação Generalizadas para comparação dos percentuais de positividade entre as avaliações em cada método.	68
Tabela 8	Tabela 8: Descrição dos casos positivos para CMV por RT-PCR, antigenemia e Nested-PCR de acordo com as semanas estudadas	69
Tabela 9	Tabela 9: Infecção pelo CMV e HHV-6, manifestações clínicas e alterações laboratoriais observadas nos pacientes.	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura do Citomegalovírus Humano (CMV)	33
Figura 2	Numero de episódios de positividade do HHV-6 pela RT-PCR de acordo com as semanas.	63
Figura 3	Infecção por HHV-6 (herpesvirus humano – 6) associada à encefalite no período pós-transplante (P = 0,012)	65
Figura 4	Distribuição do percentual de positividade para o CMV ao longo do tempo avaliado pelos 3 métodos diagnósticos	67

SUMÁRIO

	PAG.
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS	xxi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xxv
1-INTRODUÇÃO	29
2- OBJETIVOS	41
3- MÉTODO	45
4- RESULTADOS	59
5- DISCUSSÃO	73
6- CONCLUSÃO	85
7- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
8- ANEXOS	107
9- APÊNDICES	109

1- INTRODUÇÃO

Transplante De Fígado

Atualmente o transplante hepático é considerado o tratamento de escolha para doenças hepáticas agudas ou crônicas, que não sejam curáveis com outros tratamentos ou que ponha em risco a vida ou causem piora importante da qualidade de vida do paciente. (1,2)

A primeira tentativa de transplante de fígado em humano foi realizada nos Estados Unidos em 1963, porém sem sucesso. Então em 1967 houve o primeiro resultado favorável a cirurgia de transplante. (3)

Em 1978 apareceu a ciclosporina, uma inovação na imunossupressão, mas foi a partir de 1980 que se obtiveram resultados satisfatórios que elevou a taxa de sobrevida após o transplante hepático que era de 30% utilizando imunossupressão com azatioprina, corticosteróides e globulina anti-linfocítica policlonal, para mais de 70%. (4,5)

Em 1983, uma conferência do National Institutes of Health, nos EUA, passou a aceitar o transplante de fígado como uma opção terapêutica efetiva para doenças hepáticas avançadas. (6)

O primeiro transplante ortotópico de fígado (TOF) bem sucedido na América Latina foi realizado no Hospital das Clínicas em São Paulo, em 1985. A partir de então, a Unidade de Fígado passou a realizar, rotineiramente, o procedimento. (7)

A Unidade de Transplante Hepático (UTH) do HC da Universidade Estadual de Campinas UNICAMP passou a realizar transplante no início de setembro de 1991, sendo o primeiro grupo a realizar transplante no interior do Estado de São Paulo. Atualmente a UTH já realizou mais de 600 transplantes.

CMV e HHV-6 No Transplante De Fígado

Durante as duas últimas décadas, com técnicas avançadas de cirurgia, melhores protocolos de imunossupressão e melhor acompanhamento dos transplantados no pós-operatório, tem aumentado o grau de sucesso dos transplantes de fígado. As infecções oportunistas constituem um dos principais problemas para os transplantados de fígado, e os vírus HHV-6 e CMV são patógenos oportunistas frequentes nesses pacientes. ^(8, 9, 10)

O CMV e o HHV-6 são responsáveis por uma variedade de doenças causadas pela infecção primária ou por reativação de infecção latente em condições de imunossupressão, especialmente após transplante de órgãos. ^(11, 12) O CMV tem sido implicado na imunomodulação da resposta imune em pacientes transplantados de órgão e também pode aumentar o risco de infecções causadas por bactérias e fungos, bem como causar rejeição do enxerto. ^(13, 14)

Os Herpesvirus pertencem a família *Herpesviridae* que é dividida em três sub-famílias: *Alphaherpesvirinae* (Herpes simplex tipo 1 (HHV-1) e 2 (HHV-2), Herpes zoster (HHV-3), *Bethaherpesvirinae* (Citomegalovirus (CMV), herpesvirus humano 6 (HHV-6) e 7 (HHV-7)) e *Gammaherpesvirinae* (Epstein Barr (HHV-4) e Herpesvirus Humano 8 (HHV-8)). ^(15, 9)

Todos os herpesvirus possuem quatro elementos estruturais como mostra a figura 1: 1- Um nucleocapsídeo icosaédrico com aproximadamente 100 nm de diâmetro e contendo 162 capsômeros protéicos, 2- DNA viral, 3- Um envelope derivado da membrana celular e contendo glicoproteínas virais e proteínas integrais, 4-Um tegumento entre o nucleocapsídeo e o envelope. ^(16, 17)

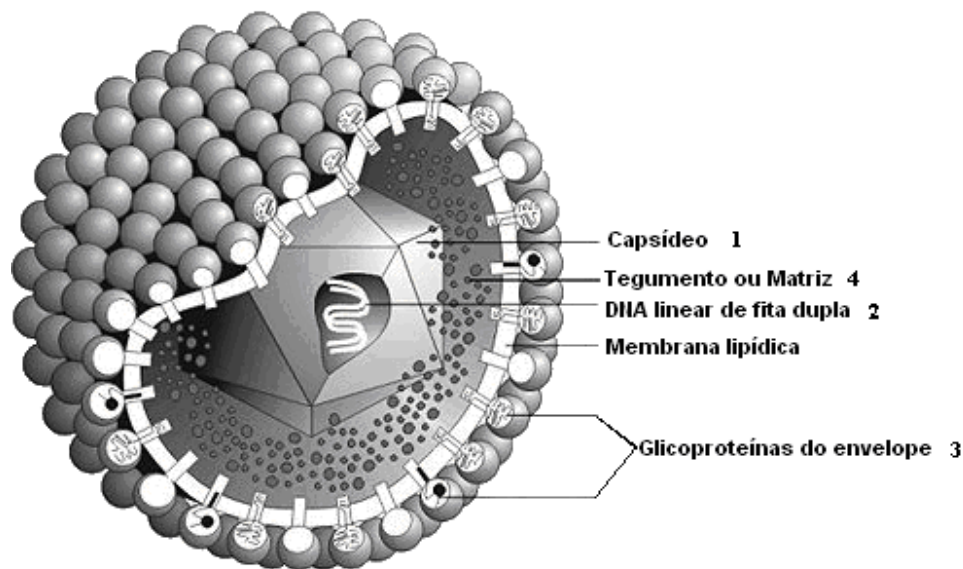


Figura 01: Estrutura do Citomegalovírus Humano (CMV). Copyright 1994 – 97 Marko Reschke
<http://www.biografix.de/hcmv/html/metaframe.htm>

Os Herpesvirus humanos têm uma capacidade única de estabelecer infecção latente contínua no hospedeiro, pelo qual o vírus pode persistir dentro das células hospedeiras e se proteger do reconhecimento imunológico, limitando a expressão dos genes virais. Em certas situações clínicas, como nos casos dos transplantados de órgãos o vírus é reativado resultando na lise de célula infectada liberando a progênie viral. ^(18, 9)

O HHV-6 possui duas variantes, A e B que possuem 90% de similaridade em suas seqüências de nucleotídeos. ^(19, 20) Apresentam características clínicas e epidemiológicas distintas. A variante B está implicada na maioria dos sintomas associados com a infecção do HHV-6, incluindo *roseola infantum*, e a variante A, está associada a vários sintomas neurológicos, refletindo seu neurotropismo. ⁽²¹⁾ É também prevalente em pacientes infectados com o *Vírus da imunodeficiência humano* (HIV). ^(22, 23)

O HHV-6 usa a molécula de CD46 como o seu receptor celular. Ele infecta principalmente linfócitos TCD4, embora também possa infectar monócitos, macrófagos e células de origem epitelial e endotelial. Como todos os Herpesvirus, o HHV-6 estabelece latência ao longo da vida do hospedeiro em células mononucleares. ⁽²⁴⁾ O HHV-6, no entanto é o único entre os herpesvirus com a capacidade de se integrar no cromossomo humano (CIHHV-6). A integração cromossômica pelo HHV-6A e HHV-6B ocorre em 1% dos seres humanos, mas o mecanismo de integração ainda não está definido. Uma vez que está integrado no cromossomo, o HHV-6 pode ser herdado. ^(25, 26, 27, 28)

Fatores que controlam a reativação e o aumento de replicação do HHV-6 em pacientes imunocomprometidos podem ser semelhantes aos que ocorrem pelo CMV. O HHV-6 tem a habilidade de reativar vírus heterólogos, isso pode explicar sua função na patogênese da doença por CMV após o transplante de fígado, podendo também influenciar no desenvolvimento de infecções fúngicas. É importante à observação da co-infecção, pois vários estudos têm relatado a possível interação direta, indireta ou a ação imunomodulatória desses dois vírus. ⁽¹¹⁾

A infecção ativa pelo CMV acontece em 30-60% nos transplantados hepáticos e 18-40% desses pacientes desenvolvem infecção sintomática após a cirurgia. ^(29, 30) Nos transplantados o HHV-6 e CMV podem causar: febre, encefalite, pneumonite intersticial e hepatite. A infecção pelo CMV é a mais importante infecção oportunista que influencia negativamente esses pacientes. ⁽³¹⁾ O HHV-6 tem sido associado com a infecção causada pelo CMV após o transplante de fígado. Recentemente, tem sido demonstrada a presença de antígenos específicos do HHV-6 em biópsias de fígado em associação com a histopatologia de fígado alográfico. ⁽³²⁾

A infecção do HHV-6 após o transplante de fígado é classificada em efeitos direto ou indireto. As manifestações clínicas diretas incluem uma doença febril, com erupção cutânea, mielossupressão, hepatite, pneumonite, doença gastrointestinal, e doenças neurológicas como encefalite. Os efeitos indiretos atribuídos ao HHV-6 incluem a exacerbação da doença do citomegalovírus (CMV), recorrência do vírus da hepatite C (VHC), aumento do risco de outras infecções oportunistas, disfunções do enxerto e rejeição celular aguda. ⁽³³⁾

A reativação após o transplante é comum e está associada com o desenvolvimento de rejeição aguda do enxerto. ⁽³⁴⁾

Recentes estudos feitos pela unidade de transplante de fígado da Unicamp vêm demonstrando a presença do CMV e do HHV-6 após o transplante, e os associando com complicações clínicas. ^(35, 36, 37, 38)

HHV-6 e a Encefalite Após o Transplante De Fígado

Nos últimos anos, o Brasil vem apresentando desenvolvimento crescente no setor transplante. Entre os anos de 2003 até o primeiro semestre de 2013, foram realizados 11,118 transplantes de fígado de doador falecido. Somando um total de 12,629 transplantados. ⁽³⁹⁾

O HHV6 é um patógeno emergente em neurologia. Em adultos, tem sido associado a várias desordens tais como esclerose múltipla ^{40,41}, epilepsia do lobo temporal ^{42,43} e principalmente a encefalite ^{44,45} especialmente em transplantados de órgãos. ^{46,47}

A encefalite é uma inflamação do cérebro, que é muitas vezes causada por uma infecção viral, que constitui uma importante causa das crises de convulsões agudas sintomáticas. ⁽⁴⁸⁾

O HHV-6 tem sido apontado como causador de encefalite em receptores de transplante fígado. ^(49, 50, 51) A encefalite ocorre tipicamente dentro das 4-6 primeiras semanas após o transplante e é caracterizada por confusão e perda de memória de curto prazo e convulsões. ⁽³³⁾ Embora ambas as variantes possam induzir a encefalite o HHV-6A parece ser mais neurotrópico implicando em doenças neurológicas. ^(52, 33)

Diagnósticos Laboratoriais

Os principais testes de diagnóstico recomendados para detecção da infecção pelo CMV incluem primeiramente a sorologia que reflete uma prévia exposição ao vírus, o teste PCR em tempo real, antigenemia e a histopatologia. ⁽⁸⁾

Para a detecção do HHV-6 a amplificação de ácidos nucleicos por reação em cadeia da polimerase (PCR) é o teste mais utilizado para o diagnóstico de infecção. No entanto, devido à elevada taxa de reativação do HHV-6 após transplante de órgãos o teste de PCR não é recomendado para a vigilância de rotina. A antigenemia e a PCR em tempo real são os métodos de escolha para o monitoramento. A sorologia não é muito recomendada uma vez que a soropositividade do HHV-6 na população mundial em alta. ^(10, 23)

Sorologia: a detecção sorológica do HHV-6 assim como do CMV, de uma resposta imune antiga ou recente se faz pela pesquisa das imunoglobulinas específicas IgG e IgM contra os vírus. A resposta positiva para IgG indica a ocorrência de uma infecção antiga, a

positividade para IgM indica uma infecção recente. ^(53, 54, 55, 56, 57) A introdução de testes laboratoriais rápidos e precoces tem permitido aos clínicos detectar a replicação viral e diagnosticar, portanto, a infecção por CMV antes do início da doença. Isso proporciona a oportunidade de iniciar o tratamento antiviral precocemente. ^(58, 59)

Exames histopatológicos e citológicos: As células de inclusão citomegálicas podem ser demonstradas em fragmentos de tecidos (fígado, rim, pulmão, etc.), em sedimento urinário, lavado gástrico e bronco alveolar e outros materiais. Quando presentes têm grande valor diagnóstico. As grandes vantagens desta técnica são sua simplicidade, rapidez e baixo custo. Contudo, a alta incidência de resultados falsos negativos limita muito seu uso e por isso deve ser complementada com técnicas mais sensíveis. ^(60, 61)

Antigenemia: A evidência de replicação viral é fornecida pela detecção do antígeno específico do vírus HHV-6 usando anticorpos monoclonais. ⁽²²⁾ E o antígeno viral pp65, que é uma proteína estrutural expressa nos leucócitos do sangue durante a fase precoce do ciclo de replicação do CMV. É uma técnica semi-quantitativa, correlacionando o número de células infectadas com mais probabilidade de desenvolvimento de manifestações clínicas associadas ao vírus. A neutropenia é uma de suas limitações e as amostras devem ser manipuladas até 6-8 horas após coletadas. ^(23, 8, 62)

Detecção de ácidos nucléicos: A detecção do DNA viral pode ser feita pela amplificação gênica utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR). O PCR permite a amplificação de um fragmento específico de DNA, cuja concentração final excede, em milhares de vezes, a inicial por meio da síntese enzimática de numerosas cópias da porção original. ^(63, 64) A reação consiste de repetidos ciclos de síntese de DNA por meio de 2 iniciadores (primers) com orientações opostas, isto é, dois segmentos de aproximadamente

20 nucleotídeos com seqüências complementares às duas extremidades do fragmento-alvo do DNA viral, mediada pela polimerase. Cada ciclo da reação é constituída por: Desnaturação: separação das hélices do DNA a ser amplificado. Anelamento: ligação complementar entre os iniciadores e o DNA a ser amplificado. Extensão: síntese do DNA pela “taq polimerase”, utilizada para replicação das fitas do DNA. A orientação dos “primers” faz com que a síntese de DNA ocorra na região interna entre eles. Assim, o produto da extensão de um “primer” é utilizado como substrato para o outro, o que resulta em cada ciclo, na duplicação da quantidade de DNA sintetizada pelo ciclo precedente. Assim, o número de cópias do fragmento alvo tem um aumento exponencial, o que faculta no final de 30 ciclos um aumento na ordem de 10⁶ cópias, partindo-se de uma única molécula. ^(63, 65) O aumento da especificidade e sensibilidade da PCR foram alcançados pela “Nested-PCR”, onde o produto da primeira PCR, amplificada com um par de “primers”, é submetido à nova reação de amplificação utilizando-se um par de “primers” internos ao primeiro, sendo o produto então detectado por eletroforese em gel de agarose. ⁽⁶⁶⁾

Porem é um método qualitativo que atualmente foi substituído pela PCR em tempo real que é uma modernização da PCR convencional e permite a quantificação exata da carga viral. ⁽⁸⁾

PCR em tempo real ou Real Time PCR: A PCR em tempo real ou real time – PCR agora é o padrão ouro de diagnóstico para os herpesvirus, pois tem melhor precisão, maior rendimento e menos risco de contaminação em comparação com a PCR convencional. ⁽⁶⁷⁾

O método utiliza um sistema fluorescente capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação, apresentando alta sensibilidade e especificidade, estando diretamente

relacionada à escolha dos “primers” e sondas (se for o caso), e a precisão é determinada pela Ct (threshold cycle), que é calculada durante a fase exponencial da reação. ⁽⁶⁸⁾ O sistema TaqMan utiliza sondas marcadas com corantes fluorescentes e específicas para o segmento gênico cuja expressão se deseja estudar, e apresentam uma substância (fluoróforo na posição 5' da sonda) que é capaz de absorver a energia luminosa emitida pelo equipamento e dissipá-la na forma de luz e calor, em comprimento de onda diferente do original. Outra forma de realização da Real-time PCR utiliza um corante, o Sybr Green, em substituição à sonda Taqman. O princípio do método é baseado na detecção de fluorescência no tubo de reação à medida que DNA é gerado, em virtude da concentração do corante entre as cadeias de DNA geradas. ⁽⁶⁹⁾

Ambos os sistemas de emissão de luz (sonda TaqMan e Sybr Green) podem ser utilizados para detecção e quantificação pela Real-time PCR. O sistema TaqMan aumenta a especificidade da reação, mas apresenta um maior custo pela utilização de um oligonucleotídeo modificado além dos primers habituais para PCR. Já o Sybr Green é agente inespecífico e revela qualquer dupla fita gerada na reação de amplificação. ⁽⁶⁹⁾

A Real-time PCR é utilizada para a detecção e monitorização da carga viral, sendo utilizada principalmente em pacientes imunossuprimidos, por auxiliar na predição do risco do paciente desenvolver doença por CMV. Até o momento não há um consenso estabelecido internacionalmente de ponto de corte para a carga viral para início de terapia ou tratamento. ⁽⁷⁰⁾

Devido à importância da encefalite no período pós-transplante, assim como as infecções causadas pelos herpesvirus e as complicações associadas a eles, e também pouco

estudadas no Brasil, se fez necessário este estudo para auxiliar a compreensão da inter-relação existente e a avaliação de possíveis efeitos patogênicos.

2- OBJETIVOS

Principal

- Avaliar a cinética viral do HHV-6 e CMV nos pacientes submetidos ao transplante hepático correlacionando-a com a presença de encefalite e suas complicações clínicas ocorridas no período pós-transplante.

Secundários

- Quantificar e monitorizar a carga viral do HHV-6 através da técnica de PCR em tempo real em pacientes submetidos a transplante de fígado;
- Quantificar e monitorizar a carga viral do CMV através da técnica de PCR em tempo real em pacientes submetidos a transplante de fígado e compara-la com as técnicas de antigenemia e Nested-PCR.

3- MÉTODO

Trata-se de um estudo observacional, prospectivo, analítico, de coorte longitudinal, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas sob o número 430/2003, (anexo 3-adendo concedido em 2009). O termo de Consentimento (Livre e Esclarecido, apêndice -1) foi preenchido e assinado por cada paciente ou responsável no momento da coleta.

Foram estudados pacientes submetidos a transplante ortotópico de fígado acompanhados entre os anos de 2009 a 2012. No total foram estudados 70 pacientes transplantados pela Unidade de Transplante Hepático (UTH) do Hospital de Clínicas da Unicamp e acompanhadas no Ambulatório do Gastrocentro da Universidade Estadual de Campinas. Destes, 30 se enquadraram nos critérios de inclusão para fazer parte deste estudo.

Critérios de Inclusão no Estudo

- Ter mais de 18 anos, independente do sexo;
- Ter Consentimento Livre e Esclarecido assinado para a coleta das amostras;
- Ter amostras disponíveis e em boas condições para análises pré-transplante de doadores com monitorização pós-transplante por um período de pelo menos 3 meses.

Critérios de Exclusão

- Foram excluídos os pacientes que evoluíram a óbito no momento da cirurgia 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 ainda não tiveram seus testes laboratoriais realizados.

Pacientes Estudados

Trinta pacientes submetidos a transplante de fígado foram envolvidos neste estudo. A monitorização dos pacientes foi realizada prospectivamente desde o pré-transplante (imediatamente antes do ato cirúrgico - dia zero) com amostras do doador e receptor, e no pós-transplante: 2^a, 3^a, 4^a, 6^a, 8^a, 10^a e 12^a semanas, somando 270 amostras. Foram coletados um tubo seco de cada paciente, centrifugado, separado o soro e armazenado em freezer a -20°C no Laboratório de Hepatologia e Bacteriologia do Gastrocentro – Unicamp, até o momento das análises.

As amostras de soro dos pacientes foram submetidas à quantificação da carga viral do CMV e do HHV-6 pela técnica de PCR em tempo real.

Os achados clínicos dos 30 pacientes foram obtidos por meio de prontuários próprios da UTH e HC-Unicamp.

A profilaxia antiviral para o Herpesvirus simples foi feita com aciclovir (200 mg de 12 / 12 horas) por dois meses.

Os pacientes não fizeram profilaxia para o CMV, a não ser que o doador fosse soropositivo e o receptor soronegativo.

Os pacientes com doença por CMV, com sintomas clínicos, receberam ganciclovir, por via intravenosa na dose de 5 mg/Kg 2 vezes ao dia por 3 semanas, seguido por dose de manutenção. Todos os receptores dessa casuística eram IgG positivo para o CMV no pré-transplante.

O esquema de imunossupressão básica padronizado na UTH constituiu de ciclosporina (0,4 mg/Kg/dia), metilprednisona (1,0g no início, 20 mg no 30º dia, 15 mg no 60º dia, 10 mg no 90º dia, 5 mg após 3 meses). Tacrolimus-FK-506 (0,1 mg/kg/dia) e micofenolato mofetil-MMF (1000 mg/dia) ou micofenolato sódico - MPS (360mg/2x dia) administrados para os pacientes do estudo.

Para a detecção e quantificação do DNA dos vírus CMV e HHV-6 foram usados os Kits comerciais “CMV Real-TM Quant” e “HHV-6 Real-TM Quant” “Sacace Biotechnologies Srl” Como, Itália.

Extração do DNA

O DNA dos vírus CMV e HHV-6 foram extraídos usando o Kit “DNA-Sorb-B” (“Sacace Biotechnologies Srl” Como, Itália) de acordo com as instruções do fabricante (anexo 1 e 2) com algumas modificações.

Detecção e Quantificação do HHV-6

O teste “HHV-6 Real-TM Quant” (Sacace Biotechnologies Srl” Como, Itália) quantifica a carga viral do HHV-6 através do DNA e detecta o controle interno (gene da β -

globina) simultaneamente. O DNA do HHV-6 é detectado pela fluorescência no canal Joe/HEX/Yellow e indicado pelo Reporter Dye – Joe, o controle interno é detectado no canal Fam/Green indicado pelo Reporter Dye – Fam. A reação de PCR seguiu o protocolo do fabricante (anexo 1) com os ciclos de amplificação descritos na tabela 1, com volume final de 25µl por reação.

Tabela 1: Ciclos de amplificação do HHV-6 pela PCR em tempo real

Passos	Temperatura	Tempo	Ciclos	
1	95 °C	15 s	1	*detecção da fluorescência nos canais Joe e Fam
2	95 °C	20 s	45	
	60 °C	1 min*		

Para calcular a concentração do DNA do HHV-6 foi seguida a seguinte fórmula:

$$\text{copias do HHV-6 em } 10^6 \text{ células} = \frac{\text{copias do DNA do HHV-6}}{\text{copias do controle interno}} \times 2 \times 10^6$$

Para calcular a concentração do DNA do HHV-6 em log foi seguida a seguinte fórmula:

$$\log \left(\frac{\text{copias do DNA do HHV-6}}{\text{copias do DNA humano}} \right) \times 200000 = \log (\text{HHV-6 em } 100000 \text{ células})$$

Detecção e Quantificação do CMV

O teste “CMV Real-TM Quant” (Sacace Biotechnologies Srl” Como, Itália) quantifica o DNA do vírus CMV e o controle interno (gene da β-globina) simultaneamente. São detectados em diferentes canais (Joe e Fam) porem na mesma amostra.

A reação de PCR seguiu o protocolo do fabricante (anexo 2) com os ciclos de ampliações descritos na tabela 2, com volume final de 25µl por reação. O produto amplificado é detectado por fluorescência. A detecção do DNA do CMV é indicada pelo Reporter Dye – Joe, e o controle Interno Reporter Dye – Fam.

As ampliações foram feitas no equipamento “7500 Real-Time PCR System” (Applied Biosystems®, New York, USA).

Tabela 2: Ciclos de amplificação do CMV pela PCR em tempo real

Passos	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	95 °C	15 min	1
2	95 °C	20 s	5
	60 °C	20 s	
	72 °C	20 s	
3	95 °C	20 s	40*
	60 °C	40 s	
	72 °C	15 s	

*detecção da fluorescência nos canais Joe e Fam

Para calcular a concentração do DNA do CMV foi seguida a seguinte formula:

$$\frac{\text{cópia do DNA do CMV}}{\text{cópia do controle interno}} \times \text{coeficiente}^* = \text{cópia do CMV/ml}$$

*o valor do coeficiente varia de acordo com o lote do kit.

Deteção do CMV pela N-PCR e Antigenemia

Os testes de Nested-PCR e antigenemia foram realizados rotineiramente para o vírus CMV, pelos laboratórios do HC-Unicamp, e seu resultados obtidos eletronicamente.

Os testes de Nested-PCR e antigenemia não foram realizados para o HHV-6.

Critérios para Caracterizar Provável Doença por CMV:

Para caracterização de provável doença por CMV, além das evidências laboratoriais de infecção citadas, fez-se necessária a presença de manifestações clínicas compatíveis com aquelas sabidamente causadas pelo CMV: ⁽⁷¹⁾

- Síndrome viral: Febre maior ou igual a 38°C, por no mínimo 3 dias, acompanhada por leucopenia ($\leq 3.000/mn^3$) e plaquetopenia ($\leq 100.000/Mn^3$) afastadas outras causas;
- Pneumonite: com sintomas respiratórios de pneumonia (achados radiológicos e/ou hipoxemia), junto com o CMV detectado por PCR em lavado brônquio-alveolar ou biópsia de pulmão;
- Doença gastrointestinal: com sintomas gastrointestinais (colite, gastrite ou esofagite) associado com histologia ou imunohistoquímica positiva para CMV de biópsias de lesões macroscópicas do trato gastrointestinal;

- Hepatite ou colangite: o vírus deve ser demonstrado em biópsias hepáticas (por cultura, imunohistoquímica, hibridização “in situ” ou PCR) em combinação com: aumento de duas vezes o valor máximo normal de alanina-amino-transferase(ALT), achados histopatológicos consistentes com hepatite ou colangite;
- Doenças neurológicas: sintomas como encefalite, mielite transversa ou outros sinais de doença difusa do sistema nervoso central juntamente com a detecção de CMV por PCR em líquido cérebro-espinhal, por cultura ou detecção do antígeno;
- Retinite: lesões oftalmológicas típicas com ou sem provas virológicas;
- Nefrite: “nefrite por CMV” pode ser definida pela detecção da infecção pelo CMV sempre 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;

Definição de Rejeição do Enxerto

Episódios de rejeição do enxerto foram documentados baseados em análises histopatológicas de material obtido por biópsias hepáticas, que são realizadas de acordo com o protocolo da UTH. A rejeição é classificada em aguda (leve, moderada e grave) ou crônica.⁽⁷²⁾

Recorrência da Hepatite C

A recorrência da hepatite C e sua gravidade foram classificados de acordo com o escore METAVIR.⁽⁷³⁾ Todos os pacientes transplantados devido a hepatite C tiveram o vírus detectado no soro através de métodos moleculares convencionais anteriormente ao transplante.^(74, 75, 76)

Encefalite

Consideramos encefalite de acordo com a literatura e o protocolo do serviço.⁽³³⁾ Os critérios utilizados para inclusão dos sintomas foram:

Febre: temperatura corporal acima de 37,5°C, tomando-se por base a medição axilar.

Sintomas Meníngeos: presença de pelo menos 3 dos sintomas: mal-estar; vômitos; rigidez de nuca; sinais de Kernig e/ou de Brudzinski.

Confusão: incoerência e lentidão da compreensão, obnubilação da consciência, perturbações da percepção e da memória e desorientação no tempo e no espaço.

Convulsões: alterações na atividade elétrica neuronal normala podendo refletir-se em nível da tonicidade corporal (gerando contrações involuntárias da musculatura, como movimentos desordenados, ou outras reações anormais como desvio dos olhos e tremores), alterações do estado mental, ou outros sintomas psíquicos.

Alterações de Linguagem: dislalias; disartrias; afasias.

Alterações visuais: diplopia; escotomas; alterações na acuidade visual.

Alterações Auditivas: zumbidos; acúfenos; alterações na acuidade auditiva.

Alterações Sensoriais: aumento ou diminuição de sensibilidade tátil, térmica ou dolorosa.

Alterações de Movimentos: paralisia; incoordenação; movimentos automáticos anormais.

Foram considerados casos de encefalite os pacientes que apresentaram no mínimo dois sintomas dos supracitados.

Infecção pelo CMV

A infecção pelo vírus CMV foi considerada quando a quantificação pela PCR em tempo real foi maior ou igual a 400 cópias/ml (de acordo com a sensibilidade do teste, dado este fornecido pelo fabricante, teste para “CMV Real-TM Quant” (Sacace Biotechnologies

Srl” Como, Itália)) e/ou dois ou mais N-PCR positivos em amostras extraídas de DNA de granulócitos de sangue periférico consecutivos num intervalo de até 30 dias, e/ou antigenemia positiva (1 ou mais células positivas) segundo critérios propostos na literatura. (71, 77, 78, 79)

Infecção pelo HHV-6

A infecção para o HHV-6 foi baseada na quantificação do DNA pela PCR em tempo real. Foi considerado positivo quando maior ou igual a 200 cópias em 10^6 células, (de acordo com a sensibilidade do teste, dado este fornecido pelo fabricante, teste para “HHV-6 Real-TM Quant” (Sacace Biotechnologies Srl” Como, Itália).

Análise Estatística

Análise descritiva com apresentação de tabelas de frequências para variáveis categóricas e medidas de posição e dispersão para variáveis numéricas.

Usou-se de análise descritiva com apresentação em tabelas de frequências para variáveis categóricas verificando-se os episódios de positividade das reações realizadas de acordo com a técnica empregada.

A comparação de variáveis categóricas foi feita usando-se o teste exato de Fisher utilizando-se o programa computacional SAS System for Windows 11.0 - 2012 (Cry, NC, USA). O nível de significância estatística foi $P < 0,05$.

Para identificar fatores associados ao aumento da carga viral foi utilizado o método das Equações de Estimção Generalizadas (EEG), utilizando-se o programa computacional

SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.2. SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, USA. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi 5%.

Análise univariada foi usada para correlacionar a presença de encefalite com as variáveis do receptor e doador com os vírus estudados.

Apoios Recebidos

- Bolsa de Doutorado Pleno – Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).
- Auxílio financeiro para a compra do reagente de Real Time para CMV e HHV-6 verba PROAP (Projeto de Orientação e Atualização Profissional – processo nº 02p 10310 / 12) – Cedido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia – FCM – Unicamp.

4-RESULTADOS

Características dos doadores

Foram envolvidos no estudo amostras de 30 doadores, cujas informações estão descritas na tabela 3.

Tabela 3: Características dos doadores

Características	n=30
Informações dos Doadores	
Idade – mediana em anos (max-min)	36,2 (14-64)
IMC - mediana em m ² /Kg (max-min)	25,9 (21-35)
UTI - mediana em dias (max-min)	5,2 (1-12)
Sexo	
Feminino	17,0 (57%)
Masculino	13,0 (43%)
Causa da Morte	
TCE	14,0 (47%)
AVC	12,0 (40%)
Anoxia	1,0 (3%)
Outros	3,0 (10%)

(IMC= Índice de massa corporal, UTI= Unidade de Terapia Intensiva, TCE = trauma crânio encefálico, AVC = acidente vascular cerebral)

Características dos pacientes envolvidos no estudo

No período pré-transplante foram obtidos dados que revelaram características gerais dos pacientes submetidos ao transplante hepático.

Dos 30 receptores, 21 (70%) eram do sexo masculino e 9 (30%) do sexo feminino. As idades variaram de 23 a 70 anos, com mediana de 52,43.

Todos os pacientes foram positivos para IgG anti-CMV, mas não para IgM antes do transplante.

Os diagnósticos mais frequentes foram hepatite C (50%), cirrose por álcool e hepatite C (13%), cirrose por álcool (10%), cirrose criptogênica (10%), outros (17%).

Foram quantificadas 240 amostras de soro dos 30 pacientes transplantados, e mais 30 amostras provenientes dos respectivos doadores, somando assim 270 amostras no total.

Deteção e quantificação do HHV-6

Detectou-se 13(43%) dos 30 pacientes com infecção para o HHV-6. Sendo que no total de 270 amostras apenas 26 (9,3%) foram positivas para HHV-6.

Dos 30 transplantados apenas um apresentou a amostra positiva do soro de seu doador.

O ponto de corte de 200 cópias de DNA do HHV-6 em 10^6 células foi seguido de acordo com as instruções do fabricante.

Seis dos 13 pacientes infectados tiveram variação de suas cargas virais entre as semanas estudadas, sendo que 3 deles apresentaram positividade na coleta no dia do transplante. A maior replicação entre as 2^a-4^a semanas e oitava semana (figura 2).

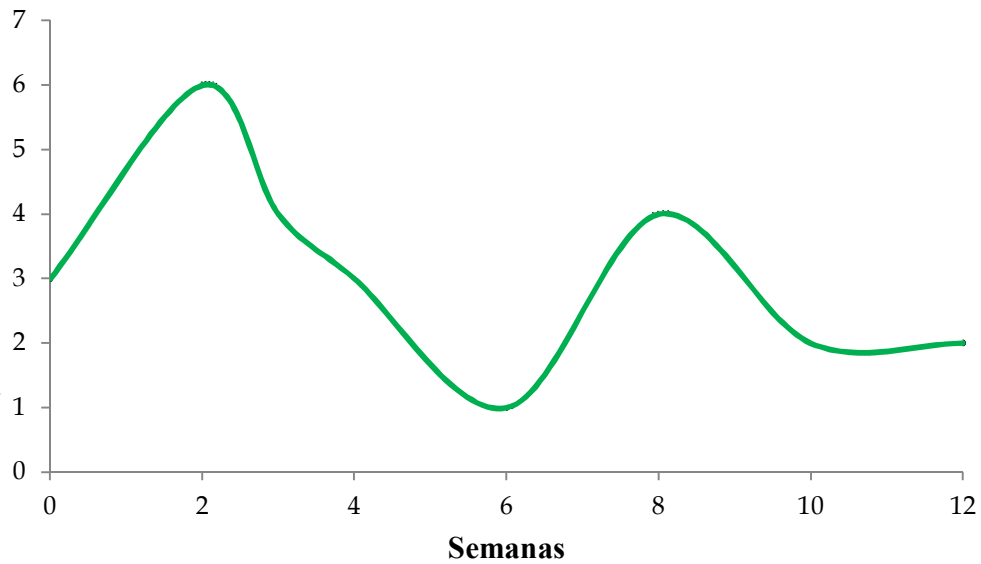


Figura 2: Numero de episódios de positividade do HHV-6 pela PCR em tempo real de acordo com as semanas.

A cinética viral foi estudada semanalmente e relacionada com as variáveis como demonstrado na tabela 4.

Tabela 4: Positividades da infecção pelo HHV-6 em log de acordo com as semanas estudadas

Caso	Doador	Semana 0	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12
4			25	1,6	21	21	27	7,7	
44	5,8	9					26		12
16				25	19		9		
17				5,1			4,4		
3		5,8	7,8						
18			3,9		3				
54		4,4							
7								9,9	
66				7					
60			1,7						
53			14						
42			13						
24									3,5

A análise univariada, resultado das Equações de Estimação Generalizadas (EEG) para estudo da relação entre as variáveis de interesse, demonstrou que o aumento da carga viral do HHV-6 se correlacionou com a presença de encefalite (tabela 5) após o transplante de fígado (valor-p= **0.0226**).

Tabela 5: Resultados das Equações de Estimação Generalizadas (EEG) para estudo da relação entre as variáveis de interesse e a carga viral HHV-6 ao longo das avaliações.

Variável	Valor-p
Doador	
Real Time HHV-6	0.3025
Índice de Massa Corporal	0.8223
Idade	0.7141
Receptor	
Rejeição	0.3739
Recidiva do vírus da hepatite C	0.5710
Encefalite	0.0226
Idade	0.8517
Tempo de cirurgia (minutos)	0.7044
Isquemia fria (minutos)	0.2134
Isquemia quente (minutos)	0.1310
Aspartato transaminase	0.3286
Alanina transaminase	0.3497
Gama glutamil transpeptidase	0.2879
Bilirrubina total	0.9230
Ureia	0.7446
Creatinina	0.1972
Tacrolimus / Ciclosporina	0.9880
Micofenolato de sódio / Azatioprina	0.7650
Sirolimus / Everolimus	0.9581

Dos 30 pacientes estudados, 14 (46,6%) desenvolveram a doença pelo CMV. Destes 14 doentes sete apresentaram positividade do HHV-6 no PCR em tempo real.

Houveram 10 (33%) casos de rejeição celular aguda entre os transplantados estudados, sendo que cinco apresentaram infecção pelo HHV-6, mas não houve correlação significativa.

Dos dezenove pacientes transplantados devido a hepatite causada pelo vírus C, seis (31%) apresentaram recidiva viral e 3 destes apresentaram a infecção pelo HHV-6 sem apresentar significância estatística.

A encefalite foi diagnosticada em 9/30 (30%) pacientes, sendo que sete deles tiveram a infecção pelo HHV-6 (figura 3), o que foi estatisticamente significativo ($p=0,012$ teste exato de Fisher).

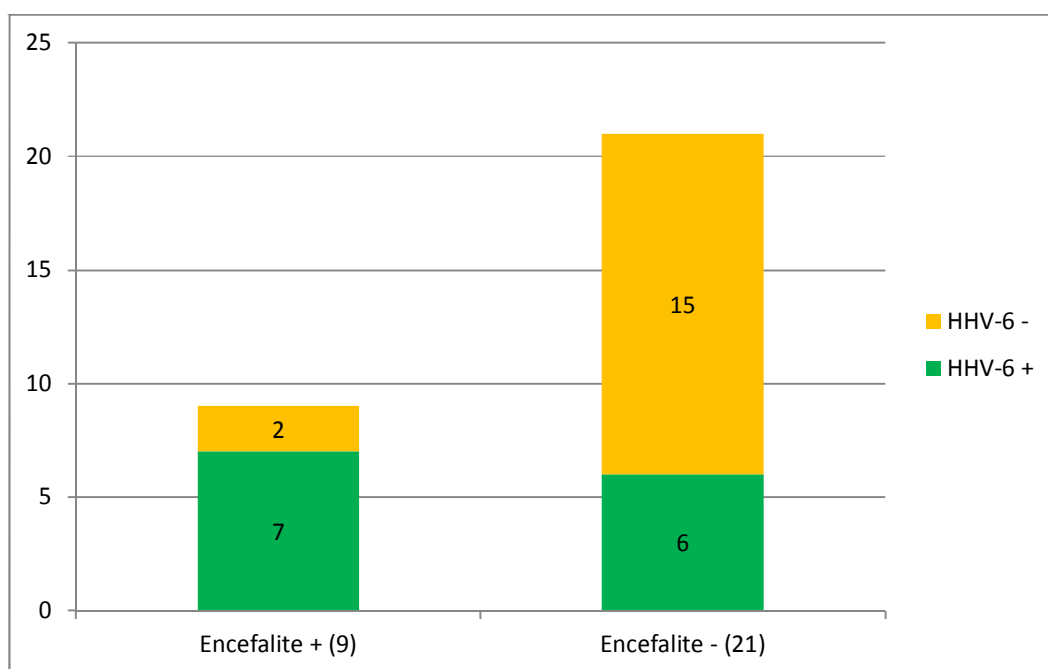


Figura 3: Infecção por HHV-6 (herpesvirus humano 6) associada à encefalite no período pós-transplante ($P = 0,012$)

Detecção e quantificação do CMV

A PCR em tempo real detectou 88 amostras de soro positivas para CMV, sendo que 26/30 (86,6%) pacientes apresentaram infecção para CMV.

A antigenemia foi positiva para o CMV em 38 amostras de 23/30 (76,6%) pacientes.

Para a N-PCR foram encontradas 55 amostras positivas em 22/30 (73%) pacientes.

Comparando os três testes, observamos que o PCR em tempo real apresentou maior sensibilidade (tabela 6) e positividade (figura 4) nas amostras ao longo das semanas estudadas.

Tabela 6: Medidas de acurácia, sensibilidade, especificidade, valores preditivo positivo e negativo dos testes para CMV em relação à doença do CMV.

	RT - PCR	AGM	N - PCR
Sensibilidade	92,85%	85,71%	85,71%
Especificidade	18,75%	31,25%	37,5%
Valor preditivo positivo	50%	52,17%	54,54%
Valor preditivo negativo	75%	71,42%	75%
Acurácia	55,8%	58,48%	61,60%

RT-PCR = real time - protein chain reaction (reação em cadeia da polimerase); AGM = antigenemia; N-PCR = nested protein chain reaction (reação em cadeia da polimerase); CMV= citomegalovírus.

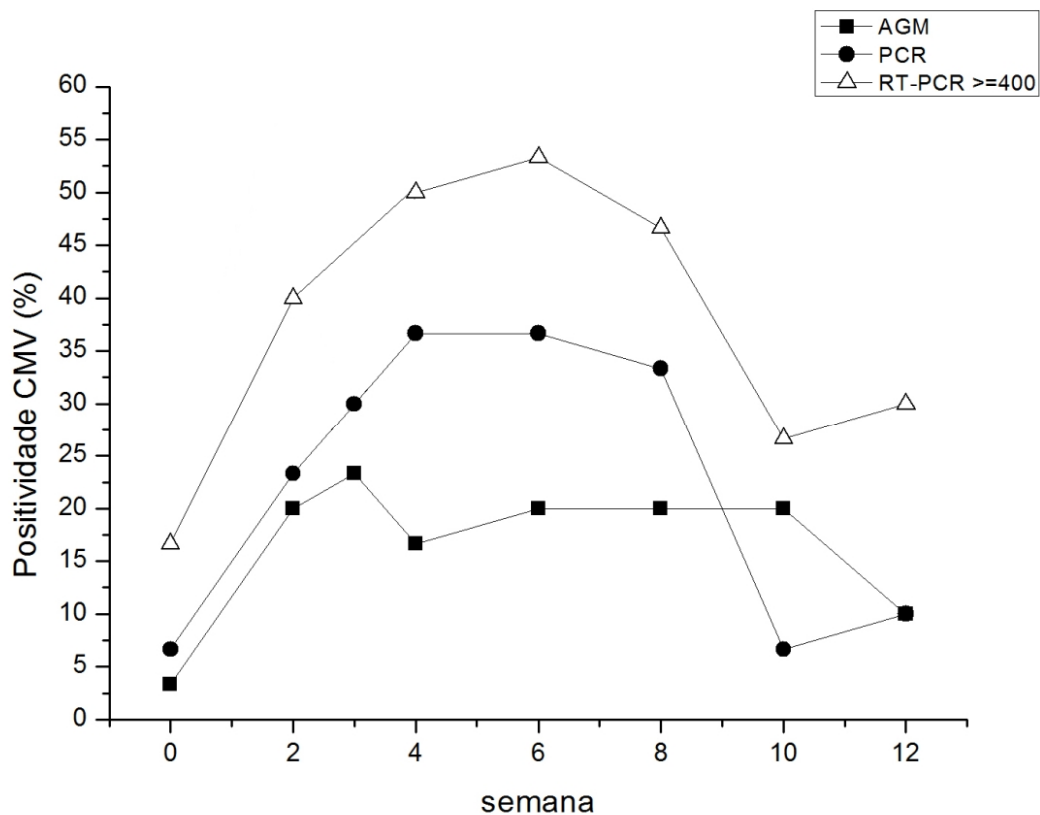


Figura 4: Distribuição do percentual de positividade para o CMV ao longo do tempo avaliado pelos 3 métodos diagnósticos.

RT-PCR = real time - protein chain reaction (reação em cadeia da polimerase); AGM = antigenemia; N-PCR = nested protein chain reaction (reação em cadeia da polimerase); CMV= citomegalovírus.

O resultado das Equações de Estimação Generalizadas para comparação dos percentuais de positividade entre as avaliações em cada método mostrou que o RT-PCR apresentou aumento significativo no início da segunda semana e na decima para a decima segunda semana em relação aos outros testes. O Nested-PCR apresentou queda significativa da oitava para a decima semana, queda, está, não apresentada nos outros teste, como mostra a tabela 7.

Tabela 7: Resultados das Equações de Estimação Generalizadas para comparação dos percentuais de positividade entre as avaliações em cada método.

Método	Aval (valor-p teste de contrastes)
AGM	0x2 0.0253 aumento significativo do início para a 2ª semana
	8x10 1.0000
	10x12 0.3182
PCR	0x2 0.0588
	8x10 0.0114 queda significativa da 8ª para a 10ª semana
	10x12 0.0829
RT-PCR \geq 400	0x2 0.0082 aumento significativo do início para a 2ª semana
	8x10 0.0578
	10x12 0.0338 aumento significativo da 10ª para a 12ª semana

RT-PCR = real time - protein chain reaction (reação em cadeia da polimerase); AGM = antigenemia; N-PCR = nested protein chain reaction (reação em cadeia da polimerase).

A Descrição dos casos positivos para CMV por RT-PCR, antigenemia e Nested-PCR de acordo com as semanas estudadas positividade das amostras esta descrita na tabela 8.

Tabela 8: Descrição dos casos positivos para CMV por RT-PCR, antigenemia e Nested-PCR de acordo com as semanas estudadas.

Caso	RT-PCR CMV (sem)	AGM CMV (sem)	Nested-PCR CMV (sem)
54	3-4	3	4
56	2	6	4-6
4	2-4-6-8-12	3	0-4
7	0-2-4-6-8-10-12	4-8	4-8
44	2-4-6-8-10-12	2-3	6-8
16	2-3-4-6-8-10-12	3	2-3-6-8
55	6-8	8	4-6-8
17		6	
24			
6	3-4-12	3-12	3-4-12
3	3-4-6-8		2-4
65	2-3-6-10-12	4-10-12	3-4-10-12
28	0-2	0-2-10	
19	2		2
18	3-6	3	6-8
46	3-6-8-	4	6
22	12		3
66	0-2-3-4-6-8-10-12	6-8	3-6-8-12
60	0-2-4-6-8-10-12	10	
37	0-2-6		
31	4-10	3	
20	4-6-8	4-6	4-6
32		10	
53	2-3-4	4-6	0-2-3-4
36	4-8-10	8-10	8
71		2-8-10	
49	4-6-8	2	2-3-4-6-8
72	6	2-6-8	2-3-6-8-10
42	6-8		6-8
35	4-8		2-3
Total	88	38	54

RT-PCR = real time - protein chain reaction (reação em cadeia da polimerase); AGM = antigenemia; N-PCR = nested protein chain reaction (reação em cadeia da polimerase); CMV= citomegalovirus; sem = semanas observadas

Como apresentado 14/30 (46,6%) pacientes estudados desenvolveram a doença pelo CMV.

Houve 10 (33%) casos de rejeição celular aguda entre os 30 transplantados estudados, sendo que nove apresentaram infecção pelo CMV como apresentado na tabela 9, porem sem significância.

A encefalite foi diagnosticada em 9/30 (30%) pacientes como mostra a tabela 9, sendo que sete deles tiveram a infecção pelo CMV. Porem não houve significância estatística em relação a infecção pelo CMV e os casos de encefalite.

Dezenove pacientes transplantaram devido a hepatite causada pelo vírus C, sendo que seis (31%) apresentaram a recidiva viral ao longo do estudo e 5 destes apresentaram a infecção pelo CMV (tabela 9), não apresentando significância estatística.

Detectou-se 11 (36,6%) pacientes com infecção para ambos os vírus.

Tabela 9: Infecção pelo CMV e HHV-6, manifestações clínicas e alterações laboratoriais observadas nos pacientes.

Caso	RT-PCR HHV-6 (sem)	RT-PCR CMV (sem)	Encefalite	Doença CMV	RCA	Recidiva do vírus C	Manifestações Clínicas/ laboratoriais
4	2-3-4-6-8-10	2-4-6-8-12	S	S	N	N	Síndrome viral + colite + Alteração de movimentos e sensoriais
7	10	0-2-4-6-8-10-12	S	S	N	N	Síndrome viral + confusão mental + Alteração sensorial
16	3-4-8	2-3-4-6-8-10-12	S	S	N	N	Síndrome viral + colite + confusão mental + alteração de movimentos
17	3-8		S	N	N	S	Confusão mental + Alteração sensorial + letargia
24	12		S	S	S	N	Síndrome viral + confusão mental + alteração de movimentos
3	0-2	3-4-6-8	S	N	S	S	Colite+ tremor + febre + confusão mental + Alteração sensorial
28		0-2	S	S	N	N	Síndrome viral + Colite + Infecção bacteriana (<i>Klebsiella sp</i>) + confusão mental + alteração de movimentos
19		2	S	S	S	N	Síndrome viral + Infecção bacteriana (<i>Klebsiella sp</i>) + alteração de movimentos e linguagem
18	2-4	3-6	S	N	S	N	Síndrome viral + Infecção bacteriana (<i>Staphylococcus aureus</i>) + confusão mental + convulsões + alterações de movimentos
46		3-6-8-	N	S	N	N	Síndrome viral
44	D-0-8-12	2-4-6-8-10-12	N	S	N	S	Colite + Infecção bacteriana (<i>Klebsiella sp</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>)
55		6-8	N	S	S	N	Colite
6		3-4-12	N	S	S	N	Colite
65		2-3-6-10-12	N	S	N	N	Colite+ encefalite
54	0	3-4	N	S	N	N	Colite
56		2	N	S	N	S	Síndrome viral + aumento de enzimas
22		12	N	N	S	S	Síndrome viral+Colite
66	3	0-2-3-4-6-8-10-12	N	S	N	N	Síndrome viral + Infecção bacteriana (<i>Staphylococcus aureus</i>)
60	2	0-2-4-6-8-10-12	N	N	S	N	Aumento de enzimas
37		0-2-6	N	N	N	N	Assintomático
31		4-10	N	N	N	S	Aumento de enzimas
20		4-6-8	N	N	N	N	Colite
32			N	N	N	N	Assintomático
53	2	2-3-4	N	N	S	N	Aumento de enzimas + Infecção bacteriana (<i>Escherichia coli</i>)
36		4-8-10	N	N	N	N	Síndrome viral
71			N	N	N	N	Assintomático
49		4-6-8	N	N	S	N	Aumento de enzimas
72		6	N	N	N	N	Infecção bacteriana (<i>Enterococcus spp</i>)
42	2	6-8	N	N	N	N	Infecção bacteriana (<i>Staphylococcus aureus</i>)
35		4-8	N	N	N	N	Infecção bacteriana (<i>Klebsiella sp</i>)

RT-PCR = real time - protein chain reaction (reação em cadeia da polimerase); AGM = antigenemia; N-PCR = nested protein chain reaction (reação em cadeia da polimerase); RCA= rejeição celular aguda; CMV= citomegalovírus; HHV-6= herpesvirus humano -6. sem = semanas observadas; D = doador; S = sim; N = não.

Resultados

5-DISSCUSSÃO

Os herpesvirus humanos possuem uma capacidade de estabelecer infecção latente contínua no hospedeiro, pois o vírus pode persistir dentro das células hospedeiras se protegendo do reconhecimento imunológico. ⁽¹⁸⁾ As manifestações infecciosas por herpes vírus são as mais frequentes nos transplantados de órgãos, pois a ativação da infecção latente acontece em pacientes imunossuprimidos como os receptores de órgão. ^(80, 81, 82)

A infecção pelo CMV e HHV-6 é frequentemente observada nos transplantados de fígado. ^(35, 79, 83, 84) Na literatura, a incidência da infecção pelo HHV-6 após o transplante de fígado é comum e ocorre entre 20% e 80%. ^(85, 11)

No presente estudo foram analisadas amostras de soro, e a presença da infecção pelo HHV-6 foi observada em 43% dos pacientes após o transplante de fígado, apresentando maior pico de replicação entre a segunda, quarta e oitava semana.

A infecção do HHV-6 em um estudo com transplantados de órgãos sólidos foi de 40-50% nos receptores ⁽⁸⁶⁾ e o pico de viremia tem sido demonstrado entre as 2^a e 4^a semanas depois do transplante. ^(23, 11)

Um estudo com transplantados renais a infecção por HHV-6 ocorreu em 27% dos transplantados e a media de tempo de replicação foi de 28 dias. ⁽⁸⁷⁾ Outro estudo, acompanhou 36 receptores de fígado por 6 meses, encontrando 50% de positividade para o HHV-6 em sangue total. ⁽⁸⁸⁾

Alguns estudos defendem que a persistência de infecção do HHV-6 detectada em amostras de sangue total, pode significar a presença do cromossomo integrado, o que naturalmente elevaria a taxa de detecção e carga viral, mas não afirmaria uma infecção. Porém, para confirmação do CIHHV-6 seria necessário análise citogenética, análise de folículo piloso e testes de irmãos e parentes. ^(24, 26, 27, 28)

No presente estudo não foi estudado a presença do CIHHV-6 nas amostras positivas para o HHV-6.

A infecção pelo HHV-6 pode provocar efeitos clinicamente relevantes ao transplantado de fígado, possivelmente como resultado dos seus efeitos imunomoduladores. Acredita-se que o vírus pode estar envolvido com doenças do sistema nervoso central como a encefalite, que é um dos efeitos diretos da infecção pelo HHV-6 após o transplante de fígado. ^(89, 85) A encefalite é uma complicação associada com a infecção do HHV-6 que ocorre entre as 4^a - 6^a semanas depois do transplante de fígado, é caracterizada por confusão mental, perda de memória e convulsões. ^(50, 90, 91)

Um estudo com complicações do sistema nervoso central tais como alterações do estado mental de etiologia não identificada foram mais prováveis de ocorrer em receptores de transplante de fígado que tinham infecção pelo HHV-6. ⁽⁴⁹⁾

O diagnóstico da infecção pelo HHV-6 em nosso estudo foi realizado pela quantificação da carga viral usando PCR em tempo real em amostras de soro. A cinética viral foi acompanhada até a 12^a semana após a cirurgia.

Foi observado no presente estudo, que o aumento semanal da carga viral do HHV-6 esteve relacionado com a presença de encefalite nos pacientes após o transplante.

Nove dos 30 pacientes desenvolveram encefalite após o transplante, sendo que, sete deles apresentaram infecção para o HHV-6, mostrando que a infecção pelo HHV-6 influenciou o aparecimento da encefalite.

Recentemente, estudos veem mostrando que os sintomas associados à encefalite estão presentes em transplantados de fígado positivos para a infecção pelo HHV-6. ⁽³⁷⁾ Assim como a relação das infecções dos herpes vírus incluindo o HHV-6 no sistema

nervoso central em pacientes imunocomprometidos nas manifestações clínicas de encefalite.⁽⁹²⁾ Os testes laboratoriais baseados na detecção da carga viral aumentaram a sensibilidade e a rapidez dos testes de diagnósticos para encefalite causada por HHV-6 e das infecções sistêmicas dos vírus HHV-6 e CMV em pacientes transplantados.⁽⁹⁾

Dos 9 transplantados com encefalite, 7 possuíam infecção para CMV, porém não houve significância estatística entre eles.

Ono et al pesquisou a carga viral do HHV-6 e CMV em 8 semanas após o transplante, porém não encontrou nenhum sintoma clínico associado.⁽⁹⁾

Humar et al não observaram uma associação significativa entre a infecção pelo HHV-6 e doenças neurológicas.⁽⁹⁰⁾ Nossos resultados podem ser diferentes devido ao neurotropismo entre as variantes do HHV-6. O HHV-6 é composto por duas variantes HHV-6A e HHV-6B e a variante A parece ser mais neurotrópica e tem sido relacionada principalmente com doenças neurológicas⁽³³⁾, porém no presente estudo não foi estudado as variantes do HHV-6.

Outro estudo sugere que as características da encefalite causada pelo HHV-6 são diferentes entre a infecção primária e reativação nos transplantados.^(90, 91)

Além do HHV-6 a infecção pelo CMV após o transplante de fígado é bastante comum, estudos apontam que a infecção pelo CMV é uma das infecções virais mais comuns encontradas em transplantados de fígado e sua incidência pode variar de acordo com diversos aspectos, tais como o tipo de transplante, a presença de fatores de risco associados e a utilização prolongada de profilaxia.^(94, 95)

A infecção pelo CMV neste estudo foi detectada em 86% dos transplantados através da PCR em tempo real.

Estudos realizados na UTH da Unicamp tem mostrado que a infecção pelo CMV após o transplante está em torno de 40% detectado em sangue total através da antigenemia e/ou N-PCR. ^(84, 83, 36) Lautenschlager et al. encontrou em seu estudo 60% dos pacientes com replicação viral do CMV no plasma, em transplantados de fígado. ⁽⁹⁶⁾

A alta incidência de replicação viral no nosso estudo foi provavelmente devido ao facto de ter sido realizado em uma área endêmica. Todos os nossos receptores e doadores eram sorologicamente (IgG) positivos antes do transplante. Sabe-se que o CMV é um vírus onipresente infectando quase 100% dos adultos em áreas endêmicas. ⁽⁹⁷⁾

Um estudo recente realizado mostrou positividade para o CMV (IgG) em 94,7% dos pacientes antes do transplante. Eles relacionaram a importância da investigação sorológica e exames de diagnóstico antes do transplante, visando minimizar possível reativação da doença após a utilização de drogas imunossupressoras, em especial nos primeiros 6 meses após o transplante, ou mesmo para evitar uma primeira infecção. ⁽⁹⁸⁾

A sorologia anti- IgM e anti-IgG inclui um dos testes de diagnóstico para o CMV e recomenda-se que seja realizado antes de todo transplante em amostras de doadores e receptores, para que seja reconhecido uma possível replicação viral ou uma replicação viral tardia. ⁽⁸⁾

A PCR em tempo real em nosso estudo apresentou 88 amostras de soro positivas para o CMV, a antigenemia foi positiva em 39 amostras, e a N-PCR apresentou 55 amostras positivas. Comparando os três testes, observamos que a PCR em tempo real foi estatisticamente significativa em apresentar mais positividade nas amostras ao longo das semanas estudadas.

Muitos estudos tem comparado antigenemia com a PCR e tempo real para diagnosticar o CMV em transplantados e em geral a PCR em tempo real tem se mostrado mais eficiente para o diagnostico. ^(99, 100, 101)

Neste estudo observou-se maior sensibilidade para a PCR em tempo real do CMV em relação a antigenemia e N-PCR. Porem apresentou baixa especificidade para os testes. Peres et al. Encontrou valores parecidos com os nossos em um estudo comparando a PCR em tempo real e N-PCR em transplantados de medula óssea. ⁽¹⁰²⁾

Marchetti et al. comparou a antigenemia com PCR em tempo real em transplantados, e encontrou que a PCR em tempo real foi mais eficiente em detectar a replicação do CMV, onde a sensibilidade do PCR foi de 95% e a antigenemia foi de 27%. ⁽¹⁰³⁾

Em um “Consensus Guidelines” publicado em 2010 destaca que a PCR qualitativa, não é recomendável para a vigilância e o diagnostico para a infecção do CMV, uma vez que existem problemas com a especificidade do teste. ⁽⁷⁷⁾

A antigenemia é um teste semi-quantitativo utilizado como ferramenta para diagnóstico clínico da doença do CMV assim como acompanhar a resposta à terapia. Porem esse teste requer processamento imediato da amostra e em paciente com neutropenia, pode ser difícil de ser executada. ⁽⁷⁰⁾ A quantificação da carga viral pela PCR real time, revolucionou o tratamento de infecções ativas em termos de medir a resposta da terapia antiviral, incluindo a redução na imunossupressão. ⁽⁷⁰⁾

Um “Updated International Consensus Guidelines” publicado em 2013 recomenda que teste que quantifica o DNA viral é preferido, para o diagnóstico, decisões relativa à

terapia e monitorização da infecção do vírus CMV (porém ainda não foi definido internacionalmente um ponto de corte para a carga viral).

Tanto o diagnóstico pelo plasma quanto pelo sangue total são aceitáveis.

Caso não haja disponibilidade da quantificação do DNA, a antigenemia é aceitável. O importante é que os resultados devam estar disponíveis dentro de 24 a 48 horas. ⁽⁷⁰⁾

Um estudo multicêntrico internacional avaliou a variabilidade dos testes de carga viral do CMV em 33 laboratórios e demonstrou inconsistência nos valores das amostras, entre os laboratórios chegando até $3 \log^{10}$ cópias/ml de diferença. ⁽¹⁰⁴⁾

Em novembro de 2010 foi aprovado pela Organização Mundial da Saúde. ⁽¹⁰⁵⁾ uma padronização da quantificação do CMV. Apesar de estar nos estágios iniciais esta norma vai padronizar os valores da carga viral entre os laboratórios de modo que os resultados podem ser avaliados como unidades internacionais (UI) ao invés de cópias por mililitro. ⁽¹⁰⁶⁾ Porém Gandu et al estabeleceu em seu serviço um ponto de corte para iniciar o tratamento pre-empírico nos transplantados CMV soropositivos. ⁽¹⁰⁷⁾

A doença do CMV em nosso estudo ocorreu em 14 (46%) dos 30 transplantados.

A literatura estima que 25% de todos os transplantados de fígado irão desenvolver a doença CMV nos primeiros meses após o transplante ⁽⁸⁶⁾, porém recentes estudos mostraram que a doença do CMV pode ocorrer em até 40% dos transplantados. ^(12, 38)

Sete dos 14 transplantados que tiveram a doença pelo CMV apresentaram infecção pelo HHV-6 e 13 infecção pelo CMV. Apesar de nossas análises não mostrar significância, alguns trabalhos tem associado a infecção do HHV-6 e do CMV ao desenvolvimento da doença do CMV. ^(98, 107)

Um dos fatores de risco atribuído ao desenvolvimento doença do CMV após o transplante de fígado é a infecção pelo CMV ⁽³⁰⁾ Fitzgerald et al. demonstrou que o status sorológico do CMV no doador e no receptor são os fatores mais importantes na determinação do desenvolvimento da doença grave do CMV após o transplante de órgão. (108)

A infecção pelo CMV e o desenvolvimento da doença depois do transplante de fígado, muitas vezes ocorre após o término do protocolo de profilaxia. E a utilização de diagnóstico rápido e preciso para a detecção do CMV é determinante. scott et al correlacionaram a carga viral do CMV com o aumento do risco da doença do CMV. ⁽⁹⁴⁾

Recentemente outro estudo mostrou que a presença do DNA do HHV-6 nas biópsias de fígado pré-transplante podem ser um fator de risco para o desenvolvimento da doença do CMV após o transplante. ⁽³⁵⁾

Os efeitos indiretos atribuídos ao HHV-6 incluem a exacerbação da doença pelo CMV, um aumento da gravidade da recidiva da hepatite C, aumento de outras infecções oportunistas, disfunção do enxerto, e rejeição celular aguda. Apesar da alta prevalência na população sua replicação pode ser intensificada após o transplante. ^(90, 109, 110, 111)

Os beta-herpesvirus são patógenos virais comuns, que influenciam no resultado do transplante hepático. Seus efeitos estão associados a uma maior predisposição para rejeição e redução da sobrevida do enxerto. ⁽⁹⁵⁾

No presente estudo não observamos correlação estatística, porem 33% dos pacientes desenvolveram rejeição do enxerto, 50% deles apresentaram infecção pelo HHV-6 e 90% infecção pelo CMV.

Lautenschlager et. al. encontrou em recente trabalho 26% de rejeição aguda após o transplante de fígado, e a maioria deles apresentaram infecção pelo CMV, porem assim como em nosso trabalho não encontrou diferença significativa. ⁽⁹⁶⁾

A rejeição do enxerto é um potente indutor da reativação do CMV, sendo assim considerado um fator de risco significativo para aparecimento da doença do CMV após transplante de fígado. Existem trabalhos, relatando associação entre HHV-6 e a disfunção ou rejeição do enxerto. ^(112, 85)

Um estudo da carga viral em transplantados renais mostrou associação entre a infecção do HHV-6 e a rejeição, porem nosso estudo não mostrou significância, talvez pelo fato de trabalharmos com um número pequeno de pacientes. ⁽⁸⁷⁾

A maioria dos nossos pacientes teve indicação para o transplante de fígado devido à cirrose do fígado causada por VHC. A recorrência da hepatite C ocorreu em seis dos 30 (31%) receptores, e três dos seis mostraram infecção pelo HHV -6 sendo que 5 (83%) foram positivos para a infecção pelo CMV após o transplante de fígado, não apresentando significância.

Bosh et al em um estudo recente com transplantados de fígado, mostrou uma associação entre a infecção do CMV e a recorrência do VHC após o transplante. ⁽¹¹⁴⁾

A recorrência do VHC é universal e leva a hepatite crônica em 20-40 % dos receptores de fígado após transplante. ⁽¹¹⁵⁾ Além disso, uma interação entre os herpesvirus e o VHC tem sido proposta e para ser clinicamente importante nos transplantados fígado. ^(75, 76, 77)

Guardia et al mostraram que os pacientes que apresentaram a presença do HHV -6 nas biópsias pré-transplante tiveram mais recorrência do VHC após o transplante. ⁽³⁵⁾

estudos prévios demonstram que o CMV e o HHV- 6 tem efeitos imunomoduladores e sugerem uma progressão mais rápida do VHC nos receptores de transplante de fígado.^(75,76,77, 117)

No entanto, no presente estudo, a incidência da infecção pelo HHV-6 e CMV não foram significativas quando comparadas com a recorrência do VHC após transplante do fígado. Devido talvez, ao nosso pequeno grupo de recorrência não foi possível identificar uma associação.

Nosso estudo mostrou que a infecção do CMV e HHV-6 estão presentes nos transplantados de fígado. Estudos vêm demonstrando que a prevenção, diagnóstico e tratamento da infecção ativa são essenciais, pois poderão impactar significativamente na melhora dos resultados após o transplante.⁽⁸⁾

Nosso trabalho analisou vários fatores de risco associados ao desenvolvimento da infecção pelos vírus durante as 12 primeiras semanas após o transplante e apesar da presença das infecções serem notável, a análise univariada encontrou associação significativa em relação ao aumento da carga viral do HHV-6 com a presença de encefalite nos transplantados de fígado.

Os limites deste estudo foi seu pequeno numero de casos analisados devido ao restrito numero de kits disponíveis para análise (é um produto importado e esse processo foi demorado, cerca de dois anos).

Estudos futuros de prevenção e tratamento antiviral para os vírus e investigações sobre o significado clínico das variantes HHV-6A e HHV-6B e a presença de CIHHV-6 em amostras de transplantados de fígado seriam importantes e muito contribuiriam para

melhora no pós-transplante. Estudos futuros de nosso UTH pode auxiliar desvendar estas suposições.

6-CONCLUSÃO

- Somente o aumento da carga viral do HHV-6 por PCR em tempo real foi associado com a presença de encefalite após o transplante de fígado,

- A técnica de PCR em tempo real se mostrou como o teste mais sensível que a antigenemia e N-PCR para detecção e monitorização do CMV nos pacientes transplantados de fígado.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-Keefe EB. Liver Transplantation: Current Status and Novel Approaches to Liver Replacement. *Gastroenterology* 2001; 120(3):749-62.
- 2- Prados E, Cuervas-Mons V. Transplante hepático. Indicaciones y contraindicaciones generales. Elección del momento. In: Berenguer J, Bruguera M, García M, Sáez LR. Tratamiento de las Enfermedades Hepáticas y Biliares. Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid: Elba. 2005; 411-23.
- 3-Küss R, Bourget P. El hígado, el páncreas y el intestino. In Küss R, Bourget P (eds). Una historia ilustrada del trasplante de órganos. Rueil-Malmaison, Sandoz 1992; 76-90.
- 4- Iwatsuki S, Starzl TE, Todo S, Gordon RD, Esquivel CO, Tzakis AG, et al. Experience in 1,000 liver transplants under cyclosporine-steroid therapy: a survival report. *Transplant Proc* 1988; 20(Suppl 1):498-504.
- 5-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.
- 6- National Institutes of Health. Consensus Development Conference Statement: Liver transplantation. June 20-23, 1983. *Hepatology*, 4(suppl): S107-10, 1984.
- 7- Raia S, Nery JR, Mies S. Liver transplantation from living donors. *Lancet* 1989; 2: 497.
- 8- Kotton CN. CMV: Prevention, Diagnosis and Therapy. *Am J Transplant*. 2013; 13(3):24-40;
- 9- Fishman JA. Overview: cytomegalovirus and the herpesviruses in transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13(3):1-8;
- 10- Razonable RR. Human herpesviruses 6, 7 and 8 in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*. 2013; 13(3):67-77;

- 11- Lautenschlager I, Razonable RR. Human herpesvirus-6 infections in kidney, liver, lung, and heart transplantation: review. *Transpl Int*. 2012 May;25(5):493-502
- 12- Razonable RR, Humar A; AST Infectious Diseases Community of Practice. Cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013; 13(4):93-106.
- 13- Shibolet O, Ilan Y, Kalish Y, Safadi R, Ashur Y, Eid A, et al. Late cytomegalovirus disease following liver transplantation. *Transpl Int*. 2003;16(12):861-5.
- 14- Guardia-Silva AC, Stucchi RS, Sampaio AM, Milan A, Costa SC, Boin IF. Detection of cytomegalovirus and human herpesvirus-6 DNA in liver biopsy specimens and their correlation with rejection after liver transplantation. *Transplant Proc*. 2012;44(8):2441-4
- 15- Roizman B, Carmichael LE, Deinhardt F, et al. Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 1981; 16: 201–217.
- 16- Biberfeld P, Kramarsky B, Salahuddin SZ, Gallo RC. Ultrastructural characterization of a new human B lymphotropic DNA virus (human herpesvirus 6) isolated from patients with lymphoproliferative disease. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79(5):933-41.
- 17- Yoshida M, Uno F, Bai ZL, Yamada M, Nii S, Sata T, et al. Electron microscopic study of a herpes-type virus isolated from an infant with exanthem subitum. *Microbiol Immunol*. 1989; 33(2):147-54.
- 18- Johnson DC, Hill AB. Herpesvirus evasion of the immune system. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998; 232: 149–177.
- 19- Ablashi DB, Agut Z, Berneman G. Human herpesvirus-6 strain groups; a nomenclature. *Arch Virology* 1993; 129: 363-366.

- 20- Dockrell DH. Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features. *Journal Medical Microbiology* 2003; 52(1):5-18.
- 21- Razonable RR, Brown RA, Wilson J, Groettum C, Kremers W, Espy M, et al. The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in transplant recipients with CMV disease. *Transplantation* 2002; 73(6):968-73
- 22- Singh N, Carrigan DR. Human herpesvirus-6 in transplantation: an emerging pathogen. *Ann Intern Med.* 1996;124(12):1065-71.
- 23- Razonable RR, Zerr DM. HHV-6, HHV-7 and HHV-8 in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009; 9(Suppl 4): S97– S100.
- 24- Pruksananonda P, Hall CB, Insel RA, et al. Primary human herpesvirus 6 infection in young children. *N Engl J Med* 1992; 326: 1445–1450
- 25- Pellett PE, Ablashi DV, Ambros PF, et al. Chromosomally integrated human herpesvirus 6: Questions and answers. *Rev Med Virol* 2012; 22: 144–155.
- 26- Lee SO, Brown RA, Eid AJ, Razonable RR. Chromosomally integrated human herpesvirus-6 in kidney transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 2391–2393.
- 27- Lee SO, Brown RA, Razonable RR. Clinical significance of pretransplant chromosomally integrated human herpesvirus-6 in liver transplant recipients. *Transplantation* 2011; 92: 224–229.
- 28- Lee SO, Brown RA, Razonable RR. Chromosomally integrated human herpesvirus-6 in transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2012; 14: 346–354
- 29- Gao LH, Zheng SS. Cytomegalovirus and chronic allograft rejection in liver transplantation. *World J Gastroenterol.* 2004; 10(13):1857-61.

- 30- Katsolis JG, Bosch W, Heckman MG, Diehl NN, Shalev JA, Pungpapong S, et al. Evaluation of risk factors for cytomegalovirus infection and disease occurring within 1 year of liver transplantation in high-risk patients. *Transpl Infect Dis.* 2013; 15(2):171-80.
- 31- Paya C, Razonable RR. Cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. In: Bowden R, Ljungman P, Paya C, eds. *Transplant infection.* Vol 1. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams and Wilkins; 2003:298-325
- 32- 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; 13 Suppl 1:351-353.
- 33- Razonable RR, Lautenschlager I. Impact of human herpes virus 6 in liver transplantation. *World J Hepatol.* 2010 Sep 27;2(9):345-53.
- 34- Deborska 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 herpesvirus-6 seroconversion. *Transplant Proc* 2003; 35(6): 2199-201.
- 35- Guardia AC, Stucchi RS, Sampaio AM, Milan A, Costa SC, Pavan CR, Boin Ide F. Human herpesvirus 6 in donor biopsies associated with the incidence of clinical cytomegalovirus disease and hepatitis C virus recurrence. *Int J Infect Dis.* 2012;16(2):124-9
- 36- Milan A, Sampaio AM, Guardia AC, Pavan CR, Andrade PD, Bonon SH, et al. Identification of bacterial infections and clinical manifestation associated with cytomegalovirus in liver transplantation patients. *Transplant Proc.* 2013;45(3):1130-2

- 37- Magalhães GS, Guardia AC, Sampaio AM, Boin IF, Stucchi RS. HHV-6: clinical and laboratory investigations and correlations with encephalitis in liver transplant recipients. *Transplant Proc.* 2013;45(5):1997-9
- 38- Sampaio AM, Guardia AC, Milan A, Sasaki AN, Andrade PD, Bonon SH, et al. Co-infection and clinical impact of human herpesvirus 5 and 6 in liver transplantation. *Transplant Proc.* 2012;44(8):2455-8.
- 39- Associação Brasileira de Transplante de Órgãos, Registro brasileiro de transplante, visualizado em 20/10/2013, disponível em: <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2013/rbt2013semestre-parcial.pdf> .
- 40- Revest M, Minjolle S, Veyer D, Lagathu G, Michelet C, Colimon R. Detection of HHV-6 in over a thousand samples: new types of infection revealed by an analysis of positive results. *J Clin Virol.* 2011; 51(1):20-4.
- 41- Challoner PB, Smith KT, Parker JD, MacLeod DL, Coulter SN, Rose TM, et al. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:7440–44
- 42- Cirone M, Cuomo L, Zompetta C, Ruggieri S, Frati L, Faggioni A, et al. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: a study of T cell crossreactivity to viral and myelin basic protein antigens. *J Med Virol* 2002;68:268–72.
- 43- Uesugi H, Shimizu H, Maehara T, Arai N, Nakayama H. Presence of human herpesvirus 6 and herpes simplex virus detected by polymerase chain reaction in surgical tissue from temporal lobe epileptic patients. *Psychiatry Clin Neurosci* 2000;54:589–93

- 44- Donati D, Akhyani N, Fogdell-Hahn A, Cermelli C, Cassiani-Ingoni R, Vortmeyer A, et al. Detection of human herpesvirus-6 in mesial temporal lobe epilepsy surgical brain resections. *Neurology* 2003;61:1405–11
- 45- Torre D, Speranza F, Martegani R, Ferrante P, Omodeo-Zorini E, Mancuso R, et al. Meningoencephalitis caused by human herpesvirus-6 in an immunocompetent adult patient: case report and review of the literature. *Infection* 1998;26:402–04
- 46- Isaacson E, Glaser CA, Forghani B, Amad Z, Wallace M, Armstrong RW, et al. Evidence of human herpesvirus 6 infection in 4 immunocompetent patients with encephalitis. *Clin Infect Dis* 2005;40:890–93
- 47- Clark DA. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7: emerging pathogens in transplant patients. *Int J Hematol* 2002;76(2):246–52
- 48- Misra UK, Tin CT, Kalita J. Viral encephalitis and epilepsy. *Epilepsia*. 2008; 49(6):13–8.
- 49- Rogers J, Rohal S, Carrigan DR, Kusne S, Knox KK, Gayowski T, et al. Human herpesvirus-6 in liver transplant recipients: role in pathogenesis of fungal infections, neurologic complications, and outcome. *Transplantation* 2000; 69: 2566-73
- 50- Montejo M, Ramon Fernandez J, Testillano M, Valdivieso A, Aguirrebengoa K, Varas C, et al. Encephalitis caused by human herpesvirus-6 in a liver transplant recipient. *Eur Neurol* 2002; 48: 234-35
- 51- Singh N, Paterson DL. Encephalitis caused by human herpesvirus-6 in transplant recipients: relevance of a novel neurotropic virus. *Transplantation* 2000; 69: 2474-79

- 52- Paterson DL, Singh N, Gayowski T, Carrigan DR, Marino IR. Encephalopathy associated with human herpesvirus 6 in a liver transplant recipient. *Liver Transpl Surg.* 1999;5:454-5.
- 53- Chou S. Newer Methods for Diagnosis of Cytomegalovirus Infection. *Rev Infect Dis* 1990; 12(7):727-735.
- 54- Chou SW, Scott KM. Rises in antibody to human herpesvirus 6 detected by enzyme immunoassay in transplant recipients with primary cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol.* 1990; 28(5):851-4.
- 55- Chiu SS, Cheung CY, Tse CY, Peiris M. Early diagnosis of primary human herpesvirus 6 infection in childhood: serology, polymerase chain reaction, and virus load. *J Infect Dis.* 1998;178(5):1250-6.
- 56- Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther* 2003; 98(3):269-97.
- 57- Seed CR, Piscitelli LM, Maine GT, et al. Validation of an automated immunoglobulin G-only cytomegalovirus (CMV) antibody screening assay and an assessment of the risk of transfusion transmitted CMV from seronegative blood. *Transfusion* 2009; 49: 134–145.
- 58- Sia IG, Patel R. New Strategies for Prevention and Therapy of Cytomegalovirus Infection and Disease in Solid-Organ Transplant Recipients. *Clinical Microbiology Reviews*, 2000;13: 83-121.
- 59- Rubin RH. Preemptive therapy in immunocompromised hosts. *N. Engl. J. Med.* , 1991; 324:1057-1059.

- 60- Suassuna JHR, Machado RD. Diagnóstico das Infecções por Citomegalovírus (CMV) em Pacientes com Deficiência Imunológica. *Revista da Associação de Medicina do Brasil* 1992; 38(1): 33-47.
- 61- Pannutti CS. Citomegalia. In: Ferreira, A. W.; Ávila, S.L.M. eds. *Diagnóstico Laboratorial das principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*, 2a. edição, Editora Guanabara Koogan, Cap. 5, p. 2001;68-73.
- 62- Rayes N, Seehofer D, Lullius SG, Stein A, May G, Kahl A, et al. Monitoring of human cytomegalovirus, HHV-6 and HHV-7 infection in kidney transplant recipients by molecular methods to predict HCMV disease after transplantation: A prospective study. *Ann Transplant* 2005; 10: 23–28.
- 63- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HÁ, & Arnheim N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350-1354.
- 64- Costa SCB. Infecção por citomegalovirus (CMV); epidemiologia, diagnóstico e tratamento. *Revista Brasileira de Clínica Terapêutica* 1999; 25(1):18-28.
- 65- Shibata D, Martin WJ, Appleman MD, Causey DM, Leedom JM, Arnheim N. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1988; 158(6):1185-92.
- 66- Brytting M, Sundquist V, Stalhandske P, Linde A, Wahren B. Cytomegalovirus detection of an immediate early protein gene with nested primer oligonucleotides. *J Virol Methods* 1991; 32: 127-138.
- 67- 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 transplant patients. *J Clin Virol* 2004; 30: 258

68- Nitsche A, Steuer N, Schmidt CA, Landt O, Ellerbrok H, Pauli G et al. Detection of Human Cytomegalovirus DNA by Real-Time Quantitative PCR. *Clin Microbiol.* 2000; 38(7): 2734-7.

69- Fleury medicina e Saúde, Portal Médico, Manual de hematologia: PCR quantitativo em tempo real. Visualizado em: 10/07/2013. Disponível em: <http://www.fleury.com.br/medicos/medicina-e-saude/manuais/manual-hematologia/Pages/pcr.aspx>.

70- Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Danziger-Isakov L, Humar A; Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-Organ Transplantation. on behalf of The Transplantation Society International CMV Consensus Group. *Transplantation.* 2013; 96(4):333-360

71- Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002;34:1094–7.

72- Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology* 1997; 25(3): 658-3.

73- Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24: 289–93.

74- Read AE, Donegan E, Lake J, Ferrell L, Galbraith C, Kuramoto IK, et al. Hepatitis C in patients undergoing liver transplantation. *Ann Intern Med* 199;114:282–4.

75- Gayowski T, Singh N, Marino IR, Vargas H, Wagener M, Wannstedt C, et al. Hepatitis C virus genotypes in liver transplant recipients: impact on posttransplant recurrence,

infections, response to interferon-alpha therapy and outcome. *Transplantation* 1997;64:422–6.

76- Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheur PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994;19:1513–20.

77- Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Snyderman DR, et al. Transplantation Society International CMV Consensus Group. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* 2010;89:779–95.

78- 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(7):2815-20.

79- 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

80- Jenkins FJ, Rowe DT, Rinaldo CR, Jr. Herpesvirus infections in organ transplant recipients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10:1–7.

81- Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med* 2007; 357: 2601–2614

82- Smith C, Khanna R. Immune regulation of human herpesviruses and its implications for human transplantation. *Am J Transplant*. 2013 Feb;13 Suppl 3:9-23;

- 83- 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;43:1357–9.
- 84- Costa FA, Soki MN, Andrade PD, Bonon SH, 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(6):949-53.
- 85- Abdel Massih RC, Razonable RR. Human herpesvirus 6 infections after liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2009;15:2561–9.
- 86- De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:217–45.
- 87- Luiz CR, Machado CM, Canto CL, Christ SC, Pestana JO, Kotton CN, Camargo LF. Monitoring for HHV-6 infection after renal transplantation: evaluation of risk factors for sustained viral replication. *Transplantation*. 2013;95(6):842-6.
- 88- Karlsson T, Mannonen L, Loginov R, Lappalainen M, Höckerstedt K, Lautenschlager I. Development of a new quantitative real-time HHV-6-PCR and monitoring of HHV-6 DNAemia after liver transplantation. *J Virol Methods*. 2012; 181(1):25-36
- 89- Vinnard C, Barton T, Jerud E, Blumberg E. A report of human herpesvirus 6-associated encephalitis in a solid organ transplant recipient and a review of previously published cases. *Liver Transpl* 2009;15:1242–6.
- 90- Humar A, Kumar D, Raboud J, Caliendo AM, Moussa G, Levy G, Mazzulli T. Interactions between cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and the recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Am J Transplant*. 2002; 2(5):461-6.

- 91- Kawamura Y, Sugata K, Ihira M, Mihara T, Mutoh T, Asano Y, et al. Different characteristics of human herpesvirus 6 encephalitis between primary infection and viral reactivation. *J Clin Virol* 2011; 51(1):12-9.
- 92- Meyding-Lamadé U, Strank C. Herpesvirus infections of the central nervous system in immunocompromised patients. *Ther Adv Neurol Disord*. 2012; 5(5):279-96
- 93- Ono Y, Ito Y, Kaneko K, Shibata-Watanabe Y, Tainaka T, Sumida W, et al. Simultaneous monitoring by real-time polymerase chain reaction of epstein-barr virus, human cytomegalovirus, and human herpesvirus-6 in juvenile and adult liver transplant recipients. *Transplant Proc*. 2008; 40(10):3578-82.
- 94- Scott GM, Naing Z, Pavlovic J, Iwasenko 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(4):229-33.
- 95- 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. 2011;43(6):2145-8.
- 96- Lautenschlager I, Loginov R, Mäkisalo H, Höckerstedt K. Prospective study on CMV-reactivations under preemptive strategy in CMV-seropositive adult liver transplant recipients. *J Clin Virol*. 2013;57(1):50-3
- 97- Kim JM, Kim SJ, Joh JW, Shin M, Moon JI, Jung GO, et al. The risk factors for cytomegalovirus syndrome and tissue-invasive cytomegalovirus disease in liver transplant recipients who have cytomegalovirus antigenemia. *Transplant Proc*. 2010; 42(3):890-4
- 98- Boin ID, Boteon YL, Stucchi RS, Pereira MI, Portugal TC, Udo EY. Serological profile of pretransplantation liver patients. *Transplant Proc* 2010;42:491–3.

- 99- Hardie DR, Korsman SN, Hsiao NY. Cytomegalovirus load in whole blood is more reliable for predicting and assessing CMV disease than pp65 antigenaemia. *J Virol Methods*. 2013 Oct;193(1):166-8.
- 100- Sanghavi SK, Abu-Elmagd K, Keightley MC, St George K, Lewandowski K, Boes SS, et al. Relationship of cytomegalovirus load assessed by real-time PCR to pp65 antigenemia in organ transplant recipients. *J Clin Virol*. 2008; 42(4):335-42.
- 101- Cardenoso L, Pinsky B, Lautenschlager I, Aslam S, Cobb B, Vilchez R, et al. CMV antigenemia and quantitative viral load assessments in hematopoietic stem cell transplant recipients. *J. Clin. Virol*. 2013; 56: 108–112.
- 102- Peres RM, Costa CR, Andrade PD, Bonon SH, Albuquerque DM, de Oliveira C, et al. Surveillance of active human cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell transplantation (HLA sibling identical donor): search for optimal cutoff value by real-time PCR. *BMC Infect Dis*. 2010;10:147
- 103- Marchetti S, Santangelo R, Manzara S, D'Onghia S, Fadda G, Cattani P. Comparison of real-time PCR and pp65 antigen assays for monitoring the development of Cytomegalovirus disease in recipients of solid organ and bone marrow transplants. *New Microbiol*. 2011;34(2):157.
- 104- Pang XL, Fox JD, Fenton JM, Miller GG, Caliendo AM, Preiksaitis JK. Interlaboratory comparison of cytomegalovirus viral load assays. *Am J Transplant* 2009; 9: 258–268.
- 105- Fryer JF, Heath AB, Anderson R, Minor PD, Group tCS. Collaborative study to evaluate the proposed 1st WHO International Standard for human cytomegalovirus

(HCMV) for nucleic acid amplification (NAT)-based assays. WHO ECBS (Expert Committee on Biological Standardization) Report 2010; WHO/BS/10.2138.

106- Kraft CS, Armstrong WS, Caliendo AM. Interpreting quantitative cytomegalovirus DNA testing: Understanding the laboratory perspective. *Clin Infect Dis* 2012; 54: 1793–1797.

107- Martín-Gandul C, Pérez-Romero P, Sánchez M, Bernal G, Suárez G, Sobrino M, et al. Spanish Network for Research in Infectious Diseases. Determination, validation and standardization of a CMV DNA cut-off value in plasma for preemptive treatment of CMV infection in solid organ transplant recipients at lower risk for CMV infection. *J Clin Virol* 2013; 56(1):13-8.

108- Dockrell DH, Prada J, Jones MF, et al. Seroconversion to human herpesvirus 6 following liver transplantation is a marker of cytomegalovirus disease. *J Infect Dis* 1997; 176: 1135–1140.

109- Fitzgerald JT, Gallay B, Taranto SE, McVicar JP, Troppmann C, Chen X, et al. Pretransplant recipient cytomegalovirus seropositivity and hemodialysis are associated with decreased renal allograft and patient survival. *Transplantation* 2004;77:1405–11.

110- Harma M, Høckerstedt K, Lyytikäinen O, Lautenschlager I. HHV-6 and HHV-7 antigenemia related to CMV infection after liver transplantation. *J Med Virol* 2006;78:800–5.

111-Razonable RR, Paya CV. Infections and allograft rejection—intertwined complications of organ transplantation. *Swiss Med Wkly* 2005;135:571–3.

- 112- Griffiths PD, Ait-Khaled M, Bearcroft CP, Clark DA, Quaglia A, Davies SE, et al. Human herpesviruses 6 and 7 as potential pathogens after liver transplant: prospective comparison with the effect of cytomegalovirus. *J Med Virol* 1999;59:496–501.
- 113- Razonable RR: Cytomegalovirus infection after liver transplantation: current concepts and challenges. *World J Gastroenterol* 2008; 14:4849.
- 114- Bosch W, Heckman MG, Pungpapong S, Diehl NN, Shalev JA, Hellinger WC. Association of cytomegalovirus infection and disease with recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Transplantation*. 2012;93(7):723-8.
- 115- Wiesner RH, Sorrell M, Villamil F. Report of the first International Liver Transplantation Society expert panel consensus conference on liver transplantation and hepatitis C. *Liver Transpl* 2003;9:1–9.
- 116- Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002;34:1094–7.
- 117- Rosen HR, Chou S, Corless CL, Gretch DR, Flora KD, Boudousquie A, et al. Cytomegalovirus viremia: risk factor for allograft cirrhosis after liver transplantation for hepatitis C. *Transplantation* 1997;64:721–6.

8- ANEXOS

ANEXO - 1 Protocolo da PCR em tempo real para HHV-6

HHV6 Real-TM Quant Real-TM Real Time PCR kit for quantitative detection of Human Herpesvirus 6

DNA Protocol

1. "Lysis Solution" and "Washing Solution" (in case of their storage at 2-8°C) should be warmed up to 56°C until disappearance of ice crystals.
2. Prepare required quantity of 1.5 ml polypropylene tubes.
3. Add to each tube 300µl of "Lysis Solution".
4. Add 100µl of Samples to the appropriate tube.
5. Prepare Controls as follows:
 - Add 100µl of "C-" to tube: Cneg
 - Add 90µl of C- and 10 µl of "Pos HHV-6 & Human DNA C+" to the tube: Cpos
6. Vortex the tubes, incubate 5 min at 65°C and centrifuge for 5 sec.
7. Vortex vigorously "Sorbent" and add 25µl to each tube.
8. Vortex for 5-7 sec and incubate all tubes for 10 min at room temperature.
9. Centrifuge all tubes for 1 min at 5000g and using a micropipette with a plugged aerosol barrier tip, carefully remove and discard supernatant from each tube without disturbing the pellet. Change tips between tubes.
10. Add 300µl of "Washing Solution 1" to each tube. Vortex vigorously and centrifuge for 1 min at 5000g and using a micropipette with a plugged aerosol barrier tip, carefully remove and discard supernatant from each tube without disturbing the pellet. Change tips between tubes.
11. Add 500µl of "Washing Solution 2" to each tube. Vortex vigorously and centrifuge for 1 min at 1000g and using a micropipette with a plugged aerosol barrier tip, carefully remove and discard supernatant from each tube without disturbing the pellet. Change tips between tubes.
12. Repeat step 11
13. Incubate all tubes with open cap for 5 min at 65°C.
14. Resuspend the pellet in 50 µl of "DNA-eluent". Incubate for 10 min at 65°C and vortex periodically.

Centrifuge the tubes for 2 min at maximum speed (12000-16000 g). The supernatant contains DNA ready for amplification

RT-PCR Protocol:

Reaction volume= 25µl

1. Prepare required quantity of tubes
2. Prepare in the new sterile tube for each sample 10* μ l of PCR-mix-1 “HHV-6/G1ob”, 5,0*N of “PCR-Buffer-FRT” and 0,5*N of “TaqF DNA Polymerase”. Vortex and centrifuge for 2-3 sec
3. Add 15 μ l of “Reaction Mix” and 10 μ l of extracted DNA sample to appropriate tube. Mix by pipetting
4. For quantitative run prepare 1 negative control (add 10 μ l of “DNA-buffer” to the tube) and 4 tubes for standards. Perform QS1 and QS2 standards twice by adding 10 μ l of “Quantitation Standards HHV-6 & Glob” (QS1, QS2) into 4 tubes

Real Time Amplification

1. Close tubes and transfer them into the Real Time ThermalCycler
2. Program position of the samples, controls and standards.
3. Program the instruments as follows:

7300/7500 Real Time PCR Systems™ (Applied Biosystems)

Step	t, °C	Time	Fluorescence detection	Cycles
1	95	0.15	-	1
2	95	0.20	-	45
	60	1.00	FAM, JOE	

Results Analysis:

The results are interpreted with the software of instrument through the presence of crossing of fluorescence curve with the threshold line.

Internal Control (Human DNA) is detected on the FAM/Green channel and *HHV6* on the Joe/HEX/Yellow channel.

Calculate the concentration of copies HHV6 DNA in 10^6 cells using the following formula:

$$HHV6 \text{ copies in } 10^6 \text{ cells} = \frac{HHV6 \text{ DNA copies/reaction}}{\text{human DNA copies/reaction}} \times 2 \times 10^6$$

Calculate the concentration in logarithm of copies HHV6 DNA in 10^5 cells using the following formula:

$$\log\left(\frac{\text{copies HHV6 DNA}}{\text{copies human DNA}} \times 200000\right) = \log(\text{HHV6 in } 100000 \text{ cells})$$

Protocolo de extração de DNA (tradução)

1. "Solução de Lise" e "solução de lavagem" (no caso de armazenamento a 2-8°C) pode ser aquecido a 56°C até ao desaparecimento dos cristais de gelo.
2. Prepare a quantidade necessária para tubos de 1,5ml de polipropileno.
3. Adicionar 300 µl de "solução de lise".
4. Adicionar 100 µl de amostra em cada tubo.
5. Prepare os controlos:
 - Adicionar 100 µl de "C -" no tubo: C-
 - Adicionar 90µl de "C -" e 10 µl de "CMV Rec Pos. 1" no tubo: C+
6. Vortex os tubos e incube por 5 min em temperatura ambiente, centrifugar por 5 seg
7. Vortex vigorosamente "Sorbent" adicionar 25 µl a cada tubo.
8. Vortex por 5-7 seg cada tubo, incubar todos os tubos por 10 minutos em temperatura ambiente.
9. Centrifugar todos os tubos durante 1 min a 5000g e utilizando uma micropipeta com barreira de aerossol, cuidadosamente remover e descartar o sobrenadante de cada tubo, sem perturbar o sedimento. Alterar as ponteiras entre os tubos.
10. Adicionar 300 µl de "solução de lavagem 1" em cada tubo. Vortex vigorosamente e centrifugar durante 1 min a 5000g e utilizando uma micropipeta com barreira de aerossol, cuidadosamente remover e descartar o sobrenadante de cada tubo, sem perturbar o sedimento. Alterar as ponteiras entre os tubos.
11. Adicionar 500 µl de "solução de lavagem de 2" em cada tubo. Vortex vigorosamente e centrifugar durante 1 min a 1000g, utilizando uma micropipeta com barreira de aerossol, cuidadosamente remover e descartar o sobrenadante de cada tubo, sem perturbar o sedimento. Alterar as ponteiras entre os tubos.
12. Repita o passo 11
13. Incubar todos os tubos com tampa aberta por 5 min a 65 °C.
14. Ressuspender o sedimento em 50 µl de "DNA eluente". Incubar durante 10 min a 65°C e vortex periodicamente.
15. Centrifugar os tubos durante 2 minutos à velocidade máxima (12.000-16.000g).
16. O sobrenadante contém DNA pronto para a amplificação.

Protocolo de RT-PCR (tradução):

1. Prepare a quantidade necessária de tubos
2. Prepare novo tubo estéril para cada amostra com 10*N µl de PCR-mix-1 "HHV-6/Glob", 5,0*N de "Tampão de PCR-FRT" e 0,5*N de "TaqF DNA Polymerase." Vortex e centrifugar por 2-3 segundos
3. Adicionar 15 µl de "Mix" e 10 µl de amostra de DNA extraído no tubo apropriado.
4. Para a corrida quantitativa preparar um controle negativo (adicione 10 µl de "DNA-buffer" para o tubo C-) e 4 tubos dos padrões (realizar em duplicidade os Padrões), adicionar de 10 µl de "HHV-6 & Glob" (QS1, QS2) nos 4 tubos.

Anexos

Programa de Amplificação:

1. Fechar os tubos e transferi-los para o ThermalCycler Tempo Real.
2. Posicionar no programa as amostras, controles e padrões.
3. Programar o instrumento, como segue:

Passos	Temperatura	Tempo	Ciclos	
1	95 °C	15 s	1	*det
2	95 °C	20 s	45	ecçã
	60 °C	1 min*		o da
				fluor

rescência nos canais Joe e Fam

Os resultados são interpretados pelo software do instrumento, através da passagem de fluorescência com a linha limite. O controle interno (DNA humano) é detectada no canal FAM / verde e HHV-6 no canal Joe / Hex / amarelo.

Para calcular a concentração do DNA do HHV-6 usar a seguinte fórmula:

$$\text{copias do HHV-6 em } 10^6 \text{ células} = \frac{\text{copias do DNA do HHV-6}}{\text{copias do controle interno}} \times 2 \times 10^6$$

Para calcular a concentração do DNA do HHV-6 em logaritmo usar a seguinte fórmula:

$$\log \left(\frac{\text{copias do DNA do HHV-6}}{\text{copias do DNA humano}} \right) \times 200000 = \log (\text{HHV-6 em } 100000 \text{ células})$$

ANEXO - 2 Protocolo da PCR em tempo real para CMV

CMV Real-TM Quant Real-TM Real Time PCR kit for quantitative detection of CMV

DNA Protocol

1. "Lysis Solution" and "Washing Solution" (in case of their storage at 2-8°C) should be warmed up to 56°C until disappearance of ice crystals.
2. Prepare required quantity of 1.5 ml polypropylene tubes.
3. Add to each tube 10 µl of "Internal Control" and 300 µl of "Lysis Solution".
4. Vortex specimens for 5 Sec.
5. Add 100µl of Samples to the appropriate tube.
6. Prepare Controls as follows:
 - Add 100 µl of "C-" to tube.
 - Add 90µl of "C-" and 10 µl of "CMV Rec Pos 1" to the tube.
7. Vortex the tubes and centrifuge for 7-10 sec.
8. Vortex vigorously "Sorbent" and add 25 µl to each tube.
9. Vortex for 5-7 sec and incubate all tubes for 10min at room temperature.
10. Centrifuge all tubes for 1 min at 1000g and using a micropipette with a plugged aerosol barrier tip, carefully remove and discard supernatant from each tube without disturbing the pellet. Change tips between tubes.
11. Add 300µl of "Washing Solution 1" to each tube. Vortex vigorously and centrifuge for 1 min at 1000g and using a micropipette with a plugged aerosol barrier tip, carefully remove and discard supernatant from each tube without disturbing the pellet. Change tips between tubes.
12. Add 500µl of "Washing Solution 2" to each tube. Vortex vigorously and centrifuge for 1 min at 1000g and using a micropipette with a plugged aerosol barrier tip, carefully remove and discard supernatant from each tube without disturbing the pellet. Change tips between tubes.
13. Repeat step 12
14. Incubate all tubes with open cap for 5 min at 65°C.
15. Resuspend the pellet in 50 µl of "DNA-eluent". Incubate for 10 min at 65°C and vortex periodically.
16. Centrifuge the tubes for 2 min at maximum speed (12000-16000 g). The supernatant contains DNA ready for amplification.

RT-PCR Protocol:

Reaction volume= 25µl

1. Prepare required quantity of tubes
2. Prepare in the new sterile tube for each sample 10*(N+1) µl of “PCR-mix-1-TM”, 5,0*(N+1) µl of “PCR-mix-2-TM” and 0,5*(N+1) µl of “TaqF DNA Polymerase”. Vortex and centrifuge for 2-3 sec
3. Add 15 µl of “Reaction Mix” to appropriate tube
4. Add 10 µl of extracted DNA sample to appropriate tube
5. Prepare for each run 3 standards and 1 negative control
 - Add 10 µl of “Quantitation standards” CMV (QS1, QS2, QS3) into 3 tubes
 - Add 10 µl of “TE-buffer” to the C- tube
6. Insert the tubes in the thermalcycler.

Programming the 7300’7500 Real-Time PCR System (Applied):

1. Select in the main menu option “New” and set the data of new document: select in the window Assay the option Absolute Quantitation, in the window Template the option Blank Document. Press OK
2. In the new window in the Tools menu click button Detector Manager.
3. At the low left side of the window click File and select New. Set in the window New detector probes characteristics:
 - a. Detection of CMV DNA: in the lines Name and Description indicate CMV DNA. in the line Reporter Dye — Joe and in Quencher Dye — None, Select the Color (for example, red). Click button Create Another.
 - b. The window New detector is opened against. Set the following parameters for Internal Control: in the lines Name and Description indicate CMV ic. in the line Reporter Dye — Fam and in Quencher Dye — None. Select the Color (for example. blue), Click OK.
4. Close the window Detector manager with probes information.
5. Select window Instrument.
6. Activate Thermal profile and set the following amplification program:

Stage	Profile	Repts
1	95 °C 15 min	1
2	95 °C 20 s	5
	60 °C 20 s	
	72 °C 20 s	
3	95 °C 20 s	40*
	60 °C 40 s	
	72 °C 15 s	

7. Indicate reaction volume, 25

µl.

Results Interpretation

For each control and patient specimen, calculate the concentration of CMV DNA using the following formula:

$$\frac{\text{CMV DNA copies/specimen}}{\text{IC DNA copies/specimen}} \times \text{coefficient*} = \text{copies CMV/mL}$$

*coefficient is specific for each lot and reported in the CMV Real-TM Quant Data Card provided in the kit.

Protocolo de extração de DNA (tradução)

17. "Solução de Lise" e "solução de lavagem" (no caso de armazenamento a 2-8°C) pode ser aquecido a 56°C até ao desaparecimento dos cristais de gelo.
18. Prepare a quantidade necessária para tubos de 1,5ml de polipropileno.
19. Adicionar a cada tubo 10 µl de " Controle Interno " e 300 µl de " solução de lise".
20. Vortex por 5 seg.
21. Adicionar 100 µl de amostra em cada tubo.
22. Prepare os controles:
 - Adicionar 100 µl de "C - " no tubo: C-
 - Adicionar 90µl de "C - " e 10 µl de " CMV Rec Pos. 1" no tubo: C+
23. Vortex os tubos e centrifugar 7- 10 seg.
24. Vortex vigorosamente "Sorbent" e adicionar 25 µl a cada tubo.
25. Vortex por 5-7 seg e incubar todos os tubos por 10 minutos em temperatura ambiente.
26. Centrifugar todos os tubos durante 1 min a 1000g e utilizando uma micropipeta com barreira de aerossol, cuidadosamente remover e descartar o sobrenadante de cada tubo, sem perturbar o sedimento. Alterar as ponteiras entre os tubos.
27. Adicionar 300 µl de " solução de lavagem 1" a cada tubo. Vortex vigorosamente e centrifugar durante 1 min a 1000g e utilizando uma micropipeta com barreira de aerossol , cuidadosamente remover e descartar o sobrenadante de cada tubo, sem perturbar o sedimento. Alterar as ponteiras entre os tubos.
28. Adicionar 500 µl de "solução de lavagem de 2" a cada tubo. Vortex vigorosamente e centrifugar durante 1 min a 1000g e utilizando uma micropipeta com barreira de aerossol, cuidadosamente remover e descartar o sobrenadante de cada tubo, sem perturbar o sedimento. Alterar as ponteiras entre os tubos.
29. Repita o passo 12
30. Incubar todos os tubos com tampa aberta por 5 min a 65 °C.
31. Ressuspender o sedimento em 50 µl de "DNA eluente" . Incubar durante 10 min a 65 ° C e vortex periodicamente.
32. Centrifugar os tubos durante 2 minutos à velocidade máxima (12.000-16.000g).
33. O sobrenadante contém DNA pronto para a amplificação.

Protocolo de RT-PCR (tradução):

Volume da reação = 25 µl

1. Prepare a quantidade necessária de tubos
2. Em um novo tubo estéril, para cada amostra adicione $10 * (N + 1)$, μl de "PCR-mix-1-TM", $5,0*(N+1)$, μl de "PCR-mix-2-TM" e $0,5*(N + 1)$, μl de "TaqF DNA Polymerase."
Vortex e centrifugar por 2-3 segundos
3. Adicionar 15 μl de "Mix" para o tubo apropriado
4. Adicionar 10 μl de amostra em cada tubo
5. Prepare um corrida para 3 padrões e um controle negativo
 - Adicionar 10 μl de "Quantitation Standards CMV" (QS1, QS2, QS3) em 3 tubos
 - Adicionar 10 μl de "tampão TE" no tubo: C-
6. Insira os tubos no thermalcycler.

Programação do Sistema de PCR em Tempo Real 7300'7500 System (Applied):

1. Selecione na opção do menu principal "New" e configure os dados do novo documento: selecionar no Ensaio janela a opção de quantificação absoluta, no modelo de janela a opção Documento em branco. Pressione OK
2. Na nova janela, no menu Ferramentas clique no botão Detector Manager.
3. No lado esquerdo da janela, clique em Arquivo e selecione Novo. Definido na janela novo detector sondas características:
 - a. Detecção de DNA do CMV: nas linhas de nome e descrição indicam o DNA do CMV, na linha Reporter Dye - Joe e Dye Quencher - Nenhum , selecione a cor (por exemplo, vermelho). Clique no botão Criar Outro.
 - b. A janela Novo detector é aberto novamente . Defina os seguintes parâmetros para o Controle Interno: na linha Nome e Descrição indicar CMV ic, e na linha Reporter Dye linha - Fam e Quencher Dye - Nenhum. Selecione a cor (por exemplo. Azul), clique em OK.
4. Feche o Detector com as informações das sondas.
5. Selecione Instrumento.
6. Ative o perfil térmico e definir o seguinte programa de amplificação:

Passos	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	95 °C	15 min	1
2	95 °C	20 s	5
	60 °C	20 s	
	72 °C	20 s	
3	95 °C	20 s	40*
	60 °C	40 s	
	72 °C	15 s	

*detecção da fluorescência nos canais Joe e Fam

Para calcular a concentração do DNA do CMV foi seguida a seguinte formula:

$$\frac{\text{cópia do DNA do CMV}}{\text{cópia do controle interno}} \times \text{coeficiente}^* = \text{cópia do CMV/ml} \quad *o \text{ valor varia de acordo com o lote.}$$

ANEXO - 3 Parecer do comitê de ética



CEP, 26/05/09.
(PARECER CEP: Nº 430/2003)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

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 Emenda que inclui a detecção do DNA do HHV-6, CMV e VHC pela PCR em tempo real em amostras de soro, 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 V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de maio de 2009.


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
13083-887 Campinas - SP

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

Página 1 de 1

9- APÊNDICES

1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a colaborar com o projeto de pesquisa “ **Herpesvirus Humano HCMV, HHV-6, HHV-7 e HHV-8 no Transplante Hepático: Detecção e Monitorização pela Antigenemia e Nested-PCR**” e “**HERPESVIRUS 5 E 6 NA RECORRENCIA DA HEPATITE C APÓS TRANSPLANTE DE FÍGADO**” 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 herpesvirus e seu impacto clínico. E também do vírus da hepatite C. Serão utilizadas técnicas diferentes para a realização deste diagnóstico e que para isso serão colhidos 12 mL 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 herpesvirus 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.

Pesquisadoras Responsáveis

Ana Maria Sampaio
Ana carolina Guardia da Silva
Telefone: (19) 35218557 E-mail: carolg@fcm.unicamp.br

Paciente

Nome:
RG:

Apêndices

Apêndice 2: Análise descritiva do monitoramento dos HHV-6 e CMV

Caso	Semana 0				Semana 2 (14 dias)			
	RT-PCR HHV-6	RT-PCR CMV	AGM CMV	PCR CMV	RT-PCR HHV-6	RT-PCR CMV	AGM CMV	PCR CMV
3	5,8	0	n	n	7,8	0	n	s
4	0	8,934087	n	s	25	1685,914	n	n
6	0	0	n	n	0	397,9587	n	n
17	0	0	n	n	0	0	n	n
56	0	0	n	n	0	56738,74	n	n
54	4,4	0	n	n	0	11,21347	n	n
44	9	0	n	n	1,40E-01	932,1882	s	n
7	0	821,0576	n	n	1,01E-15	964,8576	n	n
16	0	205,9662	n	n	0	630,7508	n	s
46	0	0	n	n	0	0	n	n
22	0	0	n	n	0	0	n	n
19	0	0	n	n	0	1853,101	n	s
65	0	0	n	n	0	637,5712	n	n
18	0	0	n	n	3,9	264,3132	n	n
37	0	616,0373	n	n	0	410,7926	n	n
28	0	808,3081	s	n	0	35867,6	s	n
66	0	2338,2	n	n	0	1213,94	n	n
60	0	146790,7	n	n	1,7	452,4996	n	n
31	0	5,58188	n	n	0	0	n	n
20	0	0	n	n	0	0	n	n
53	0	0	n	s	14	2044,172	n	s
32	0	157,6577	n	n	0	0	n	n
71	0	0	n	n	0	0	s	n
36	0	0	n	n	0	0	n	n
72	0	0	n	n	0	134,2671	s	s
49	0	0	n	n	0	0	s	s
35	0	0	n	n	0	0	n	s
42	0	0	n	n	13	0	n	n
55	0	0	n	n	0	0	n	n
24	0	0	n	n	0	0	n	n

Apêndice 3: Análise descritiva do monitoramento dos HHV-6 e CMV								
Caso	Semana 3 (21 dias)				Semana 4 (28 dias)			
	RT-PCR HHV-6	RT-PCR CMV	AGM CMV	PCR CMV	RT-PCR HHV-6	RT-PCR CMV	AGM CMV	PCR CMV
3	0	728,7663	n	n	0	4509,6242	n	s
4	1,6	0	s	n	21	715,413166	n	s
6	0	1314,615	s	s	0	679,203838	n	s
17	5,1	16,70355	n	n	0	0	n	n
56	0	0	n	n	0	0	n	s
54	0	6328,074	S	n	0	475,415784	n	s
44	5,07E-03	46,68552	s	n	0	1401,87381	n	n
7	7,76E-07	77,06946	n	n	0	86762,4961	s	s
16	25	1863,17	s	s	19	2492,95461	n	n
46	0	1011,356	n	n	0	0	s	n
22	0	0	n	s	0	83,6942112	n	n
19	0	0	n	n	0	0	n	n
65	0	618,1431	n	s	0	0	s	s
18	6,03	854,0651	s	n	3	0	n	n
37	0	0	n	n	0	0	n	n
28	0	0	n	n	0	0	n	n
66	7	723,5468	n	s	0	458,323247	n	n
60	0	204,9251	n	n	0	2556,75865	n	n
31	0	0	s	n	0	731,772921	n	n
20	0	24,09702	n	n	0	2812,25856	s	s
53	0	285471,1	n	s	0	5407692,31	s	s
32	0	0	n	n	0	75,4014429	n	n
71	0	120,9339	n	n	0	0	n	n
36	0	0	n	n	0	510,569325	n	n
72	0	0	n	S	0	0	n	n
49	0	0	n	S	0	1122,75997	n	s
35	0	385,5523	n	s	0	426,260704	n	n
42	0	0	n	n	0	0	n	n
55	0	0	n	n	0	0	n	s
24	0	0	n	n	0	0	n	n

Apêndice 4: Análise descritiva do monitoramento dos HHV-6 e CMV								
Caso	Semana 6 (42 dias)				Semana 8 (56 dias)			
	RT-PCR HHV-6	RT-PCR CMV	AGM CMV	PCR CMV	RT-PCR HHV-6	RT-PCR CMV	AGM CMV	PCR CMV
3	0	1840,13523	n	n	0	1676,545	n	n
4	21	1151,69195	n	n	27	590,6783	n	n
6	0	25,9022394	n	n	0	0	n	n
17	0	146,138744	s	n	4,4	240,07	n	n
56	0	270,767454	s	s	0	94,2634	n	n
54	0	15,3634409	n	n	0	0	n	n
44	0	5191,46324	n	s	26	152263,4	n	s
7	0	3295,717	n	n	1,16E-18	7602,48	s	s
16	2,38E-11	2890,06298	n	s	9	3229,849	n	s
46	0	187894,737	n	s	0	296484,3	n	n
22	0	0	n	n	0	238,0008	n	n
19	0	0	n	n	0	0	n	n
65	0	1843,89998	n	n	0	71,11683	n	n
18	0	2103,35449	n	s	0	301,1772	n	s
37	0	408,135593	n	n	0	0	n	n
28	0	197,406222	n	n	0	41,14139	n	n
66	0	11827,3874	s	s	0	18203,08	s	s
60	0	3748,842	n	n	0	2876,31	n	n
31	0	266,035055	n	n	0	0	n	n
20	0	23544,8613	s	s	0	3466,688	n	n
53	0	5,76631445	s	n	0	166,2937	n	n
32	0	0	n	n	0	0	n	n
71	0	217,793445	n	n	0	0	s	n
36	0	281,233099	n	n	0	9029,492	s	s
72	0	1724,72303	s	s	0	181,9425	s	s
49	0	2196,93788	n	s	0	7349,601	n	s
35	0	285,86446	n	n	0	21747,32	n	n
42	0	2984,98675	n	s	0	922,2798	n	s
55	0	1253,25115	n	s	0	7467,447	s	s
24	0	0	n	n	0	0	n	n

Apêndice 5: Análise descritiva do monitoramento dos HHV-6 e CMV								
Caso	Semana 10 (70 dias)				Semana 12 (84 dias)			
	RT-PCR HHV-6	RT-PCR CMV	AGM CMV	PCR CMV	RT-PCR HHV-6	RT-PCR CMV	AGM CMV	PCR CMV
3	0	73,14149	n	n	0	0	n	n
4	7,7	0	n	n	3,62E-06	626,8173	n	n
6	0	0	n	n	0	2168,499	s	s
17	0	0	n	n	0	0	n	n
56	0	0	n	n	0	0	n	n
54	0	0	n	n	0	0	n	n
44	0	2088,179	n	n	12	2232,513	n	n
7	9,9	997,05	n	n	0	546,437	n	n
16	0	527,4183	n	n	0	412,7129	n	n
46	0	323,0543	n	n	0	0	n	n
22	0	0	n	n	0	472,3247	n	n
19	0	0	n	n	0	0	n	n
65	0	13331,06	s	s	0	5045,234	s	s
18	0	0	n	n	0	288,1107	n	n
37	0	0	n	n	0	44,78939	n	n
28	0	0	s	n	0	186,1685	n	n
66	0	7918,923	n	n	0	1067,967	n	s
60	0	34133,52	s	n	0	12313,76	n	n
31	0	451,1162	n	n	0	0	n	n
20	0	0	n	n	0	0	n	n
53	0	157,8031	n	n	0	74,20655	n	n
32	0	0	s	n	0	0	n	n
71	0	0	s	n	0	0	n	n
36	0	1101,591	s	n	0	329,484	n	n
72	0	135,2313	n	s	0	0	n	n
49	0	0	n	n	0	0	n	n
35	0	0	n	n	0	0	n	n
42	0	286,2595	n	n	0	0	n	n
55	0	37,66869	n	n	0	0	n	n
24	0	0	n	n	3,5	0	n	n



HHV-6: Clinical and Laboratory Investigations and Correlations With Encephalitis in Liver Transplant Recipients

G.S. Magalhães, A.C. Guardia, A.M. Sampaio, I.F.S.F. Boin, and R.S.B. Stucchi

ABSTRACT

Objective. Human herpesvirus (HHV) 6 infections and reactivation are emerging factors in neurology. This study aimed to verify the presence of encephalitis associated with HHV-6 positivity by antigenemia or polymerase chain reaction (PCR) in liver transplant recipients.

Methods. We analyzed the medical records and laboratory results of 20 recipients with antigenemia or a positive PCR for HHV-6. The range of the transplantation dates was September 2006 to March 2010; the period of the medical records was from the date of transplantation to 1 year thereafter. Encephalitis was diagnosed by these symptoms: fever, mening, signs, seizures, dysphasia, visual and hearing impairment, or sensory and motion alterations. "Possible encephalitis" was considered when the patients had at least 2 of the symptoms. PCR or antigenemia for HHV-6 was not performed with central nervous fluid. The correlation between HHV-6 infection and encephalitis was evaluated with the use of descriptive statistical tests.

Results. Symptoms associated with encephalitis occurred in 7/20, patients (35%): 5/20 with fever and 4/20 with mental confusion. Involuntary movements were present in 1 case. The symptoms appeared with in the first 10 days in 6/20 patients and lasted for 1 year.

Conclusions. This study showed that symptoms associated with encephalitis occurred in a considerable number of patients with positive PCR and/or antigenemia for HHV-6 after liver transplantation. This correlation needs retrospective and prospective studies to determine the specific association.

Herpesvirus reactivation is a common occurrence after liver transplantation. Cytomegalovirus (CMV) and human herpesvirus (HHV) 6 infections can cause severe diseases in these recipients.¹⁻⁴ Reactivation of endogenous latent viruses in adult solid organ transplant recipients, occur frequently, with reported infection rates of 30%-50%.⁵⁻⁷ Most patients appear to have asymptomatic viral reactivation. Clinical syndromes have been described with HHV-6, including a CMV-negative viral syndrome with hepatitis, encephalitis, and or pneumonitis.^{8,9}

Primary infection with HHV-6 is uncommon in adult solid organ transplant recipients.¹⁰ Most episodes of HHV-6 infection represent reactivation of latent virus. HHV-6 is an emerging pathogen in neurologic injuries. In adults it has been associated with disorders such as multiple sclerosis,¹¹ temporal lobe epilepsy,¹² and encephalitis, especially in immunocompetent patients.^{13,14} The present

study analyzed the presence of encephalitis among liver transplant recipients for associations with HHV-6 positivity by antigenemia or polymerase chain reaction (PCR).

METHODS

This observational, analytic, and cross-sectional retrospective study included 20 adult liver transplant grafted from September 2008 to March 2010. We analyzed their medical records and laboratory results. All recipients in this study were positive for HHV-6 according to PCR or antigenemia. The patients signed informed consent for the collection of blood samples and subsequent analysis; the study was approved by our Research Ethics Committee.

From the Faculty of Medical Science, State University of Campinas, Campinas, Brazil.

Address reprint requests to Raquel Silveira Bello Stucchi, Rua Princesa d'Oeste, 1252, ap 71, Jardim Paraíso—CEP 13100-040, Campinas—SP, Brazil. E-mail: stucchi.raquel@gmail.com

All patients had undergone prophylaxis for herpes simplex infection with 200 mg acyclovir twice a day for 60 days. All recipients showed IgG positivity for CMV before transplantation; there was no recipient serology for HHV-6 before transplantation. All donors were serologically positive for CMV but did not have HHV-6 serology results. All patients underwent standard immunosuppressive therapy based on our protocol.¹⁵

Clinical Definitions

Encephalitis was characterized by confusion, short-term memory loss, and seizures. Brain imaging may have been abnormal with hallmark changes in the medial temporal lobes.²⁶ Our protocol, considered encephalitis when the following symptoms were present: fever, meningeal signs, confusion, seizures, language, visual and/or hearing impairment, and/or sensory and/or motor changes. The symptoms were: fever (axillary body temperature > 37.5°C), at least 3 meningeal symptoms of malaise, vomiting, neck stiffness, Kernigand or Brudzinski signs, mental confusion with inconsistent and slow understanding, clouding of consciousness, disturbances of perception and memory, and disorientation in time and space; seizures; language changes of dyslalia, dysarthria, and aphasia; visual changes of diplopia, scotoma, and altered visual acuity; hearing alterations of ringing, tinnitus, and changes in acuity; sensory changes intactile, thermal, and painful ones; and abnormal movements of paralysis and incoordination.^{17–22} We considered patients who had ≥ 2 symptoms of the above cases as of “possible encephalitis”.

Statistical Analysis

Results were expressed by descriptive statistics of medians and ranges. This study was approved by our Institutional Ethics Committee.

RESULTS

The 20 transplant recipients (13 men and 7 women) showed a median age of 48 years (range, 18–67). The main indication for the transplant was hepatitis-C (HCV; $n = 7$), HCV and alcohol ($n = 4$), alcoholic liver disease ($n = 4$), primary biliary cirrhosis ($n = 2$), and hepatitis B virus ($n = 3$).

Symptoms associated with encephalitis occurred in 7 patients (35%; 1, 2, 3, 7, 8, 11, and 18) 5, of whom displayed fever and 4 confusion. Involuntary movements were present in 1 case. Symptoms had appeared in the first 10 days in 6 subjects and lasted 1 year. The clinical findings of the patients as well as those considered “possible encephalitis” are presented in Table 1.

DISCUSSION

HHV-6 infection has been demonstrated to be common among liver transplant recipients, although clinical HHV-6 disease is not. HHV-6 infections have been classified as direct or indirect effects, and encephalitis as a direct clinical manifestation.^{23,24} Encephalopathy, a complication associated with the presence of HHV-6 occurring 4–6 weeks after liver transplantation, is characterized by confusion, short-term memory loss, and seizures.^{24–26} In the present study, the symptoms appeared with in the first 10 days in 6 patients and in 1 at 15 days after transplantation. Thirty-five percent of our cohort displayed had symptoms associated with encephalitis.

A recent study reported a liver transplant patient who displayed encephalitis associated with fever and the presence of HHV-6 viral DNA in peripheral blood.⁷ All of our

Table 1. Clinical Findings of Patients Studied

Case	Etiology	Symptoms	Time After LT	Duration
18*	HCV	Confusion, fine tremor	10 days	4 months
11*	HBV	Confusion, sensory changes	7 days	2 months
4	Alcohol	Fever	7 days	1 month
5	HBV	Fever	14 days	15 days
9	HCV/Alcohol	Fever	14 days	1 month
13	Alcohol	Fever	16 days	1 month
17	Alcohol	Fever	8 days	1 week
20	HCV	Fever	21 days	10 days
7*	HBV	Fever, change hearing acuity	7 days	1 year
8*	HCV/Alcohol	Fever, mental confusion	7 days	2 months
3*	HCV/Alcohol	Fever, mental confusion, hypotonia	5 days	3 months
2*	HCV	Fever, upper limbs weakness	7 days	1 month
1*	HCV	Fever, vomiting, tremor	15 days	3 weeks
6	PBC	No symptoms	—	—
10	HCV	No symptoms	—	—
12	Alcohol	No symptoms	—	—
14	HCV	No symptoms	—	—
15	PBC	No symptoms	—	—
16	HCV/Alcohol	No symptoms	—	—
19	HCV	No symptoms	—	—

Time after LT; Appearance of human herpesvirus 6 symptoms after liver transplantation; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; PBCm primary biliary cirrhosis.

*Patients with encephalitis.

patients were positive for HHV-6 antigenemia or PCR, but only 5/7 with symptoms of with encephalitis showed fever.

Humar et al failed to observe a significant association between HHV-6 infection and neurologic illnesses.²⁷ Our results may have been different because of the neurotropism between HHV-6 variants. HHV-6 is composed of 2 variants: HHV-6A and HHV-6B. The more neurotropic variant A has been implicated mainly in neurologic diseases.¹⁶ Another study has suggested that the characteristics of HHV-6 encephalitis were different between HHV-6 encephalitis at the time of primary infection and reactivation in a transplant recipient.^{27,28}

We did not know the HHV-6 serology status of our subjects, an important limitation of the present study. The reviewed medical records contained no information about the important or examinations for HHV-6 IgG or IgM; including magnetic resonance imaging and cerebrospinal fluid analysis, reported in earlier studies to be essential to confirm the diagnosis of encephalitis. Moreover, the symptom "fever" considered in our study. It is of low specificity, being a common finding in many circumstances.

In conclusion, we observed symptoms associated with encephalitis to occur among a considerable number of patients (7/20) who, according to PCR and/or antigenemia, were positive for HHV-6 after liver transplantation. However, because it was a retrospective analysis, important examinations had not been performed for diagnostic confirmation of encephalitis associated with HHV-6.

REFERENCES

- Kusne S, Blair JE. Viral and fungal infections after liver transplantation—part II. *Liver Transpl*. 2006;12(1):2–11.
- Carratalá J, Montejo M, Pérez-Romero P. Infections caused by herpes viruses other than cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Emerg Infect Microbiol Clin*. 2012;3063–3069.
- Guardia-Silva AC, Stocchi RS, Sampalo AM, et al. Detection of cytomegalovirus and human herpesvirus-6 DNA in liver biopsy specimens and their correlation with rejection after liver transplantation. *Transplant Proc*. 2012;44(8):2441–2444.
- Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, et al. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthema subitum. *Lancet*. 1988 May 14;1(8594):1065–1067.
- Razonable RR, Brown RA, Humar A et al. Herpesvirus infections in solid organ transplant patients at high risk of primary cytomegalovirus disease. *J Infect Dis*. 2005;192(8):1331–1339.
- Milan A, Sampalo AM, Guardia AC, et al. Monitoring and detection of cytomegalovirus in liver transplant recipients. *Transplant Proc*. 2011;43(4):1360–1361.
- Sampalo AM, Guardia AC, Milan A, et al. Co-infection and clinical impact of human herpesvirus 5 and 6 in liver transplantation. *Transplant Proc*. 2012;44(8):2455–2458.
- Nash PJ, Avery RK, Tang WH et al. Encephalitis owing to human herpesvirus-6 after cardiac transplant. *Am J Transplant*. 2004;4(7):1200–1203.
- Kondo K, Kondo T, Okuno T, Takahashi M, et al. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol*. 1991;72:1401–1408.
- Ljungman P, Singh N. Human herpesvirus-6 infection in solid organ and stem cell transplant recipients. *J Clin Virol*. 2006;37:87–91.
- Cirone M, Cuomo L, Zampetta C, et al. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: a study of T cell crossreactivity to viral and myelin basic protein antigens. *J Med Virol*. 2002;68:268–272.
- Donati D, Akhyani N, Fogdell-hahn A, et al. Detection of human herpesvirus-6 in mesial temporal lobe epilepsy surgical brain resections. *Neurology*. 2003;61:1405–1411.
- Isaacson E, Glaser CA, Forghani B, et al. Evidence of human herpesvirus 6 infection in 4 immunocompetent patients with encephalitis. *Clin Infect Dis*. 2005;40:890–893.
- Clark DA. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7: emerging pathogens in transplant patients. *Am J Hepatol*. 2002;76:246–252.
- Guardia AC, Stocchi RS, Sampalo AM, et al. Human herpesvirus 6 in donor biopsies associated with the incidence of clinical cytomegalovirus disease and hepatitis C virus recurrence. *Int J Infect Dis*. 2012;16(2): 124–129.
- Razonable RR, Lautenschlager I. Impact of human herpes virus 6 in liver transplantation. *World J Hepatol*. 2010;27:345–353.
- Secchiario P, Carrigan DR, Asano Y, et al. Detection of human herpesvirus 6 in plasma of children with primary infection and immunosuppressed patients by polymerase chain reaction. *J Infect Dis*. 1995;171(2):273–280.
- Aquino VH, Figueiredo LTM. Cytomegalovirus infection in renal transplant recipients diagnosed by nested-PCR. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34(1):93–101.
- Lautenschlager I, Linnavuori K, Hockenstedt K. Human herpesvirus-6 antigenemia after liver transplantation. *Transplantation*. 2000;69:2561–2566.
- Harna M, Hockenstedt K, Lyytikäinen O, et al. HHV-6 and HHV-7 antigenemia related to CMV infection after liver transplantation. *J Med Virol*. 2006;78:800–805.
- Costa FA, Soki MN, Andrade PD, et al. Simultaneous monitoring of CMV and human herpesvirus 6 infections and diseases in liver transplant patients: one-year follow-up. *Clinics*. 2011;66(6):949–953.
- Sampalo AM, Thomasini RL, Guardia AC, et al. Cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and human herpesvirus-7 in adult liver transplant recipients: diagnosis based on antigenemia. *Transplant Proc*. 2011;43(4):1357–1359.
- Lautenschlager I, Hockenstedt K, Linnavuori K, et al. Human herpesvirus-6 infection after liver transplantation. *Clin Infect Dis*. 1998;26:702–707.
- Montejo M, Ramon J, Testillano M, et al. Encephalitis caused by human herpesvirus-6 in a liver transplant recipient. *Eur Neurol*. 2002;48:234–235.
- Humar A, Kumar D, Caliendo AM, et al. Clinical impact of human herpesvirus 6 infection after liver transplantation. *Transplantation*. 2002;73:599–604.
- Kawamura Y, Sugata K, Ihira M, et al. Different characteristics of human herpesvirus 6 encephalitis between primary infection and viral reactivation. *J Clin Virol*. 2011;51(1):12–19.



Human herpesvirus 6 in donor biopsies associated with the incidence of clinical cytomegalovirus disease and hepatitis C virus recurrence

Ana Carolina Guardia^a, Raquel Silveira Bello Stucchi^b, Ana Maria Sampaio^a, Arlete Milan^a, Sandra Cecília Botelho Costa^c, Célia Regina Pavan^d, Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin^{b,*}

^a Faculty of Medical Science, State University of Campinas, Campinas, Brazil

^b Liver Transplantation Unit, Hospital de Clínicas, State University of Campinas, Rua Aldo Oliviero Barbosa 184, Campinas – SP, Brazil, CEP 13085-030

^c Internal Medicine Department, State University of Campinas, Campinas, Brazil

^d Gastroenterology, State University of Campinas, Campinas, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 July 2011

Received in revised form 17 October 2011

Accepted 22 October 2011

Corresponding Author: Mark Holodny, California, USA

Keywords:

Liver transplantation

Cytomegalovirus

Human herpesvirus 6

Hepatitis

SUMMARY

Background: Reactivation of cytomegalovirus (CMV) and human herpesvirus 6 (HHV-6), as well as the recurrence of hepatitis C virus (HCV), occurs in the post liver transplantation period. However, their correlations remain questionable. The objectives of this study were to analyze the presence of CMV DNA and HHV-6 DNA in pre-transplant and post-transplant liver graft biopsies and to determine any correlations with CMV disease and HCV recurrence.

Methods: Forty-one liver transplant recipients were followed up in the post-transplant period. The presence of CMV DNA and HHV-6 DNA was detected by nested PCR.

Results: Four patients (4/41, 9.8%) were positive for CMV DNA in pre-transplant biopsies and three of them remained positive after transplantation; 11 patients became positive in the post-transplant biopsies ($p=0.05$). Fifteen (15/41, 36.6%) patients were positive for HHV-6 DNA in pre-transplant biopsies and 11 of these remained positive after transplantation. Another 11 patients became positive after the surgery ($p=0.05$). CMV disease occurred in 17 recipients; 10 of these 17 (58.8%) patients were positive for HHV-6 DNA in pre-transplant biopsies and they continued positive after transplantation ($p=0.0128$). Twenty-eight patients were transplanted due to hepatitis C; 12 of these patients had recurrence of the virus, and HHV-6 was positive in nine of the 12 (75%) patients ($p=0.049$).

Conclusions: Recipients with HHV-6 DNA in pre-transplant graft biopsies remained positive post transplantation, showing a possible risk for post-transplant allograft loss because there was an association between HHV-6 and recurrent HCV and CMV disease.

© 2011 International Society for Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Herpesvirus reactivation is a common occurrence after liver transplantation, and cytomegalovirus (CMV) and human herpesvirus 6 (HHV-6) infections cause severe diseases in these recipients.¹ Seronegative recipients of liver allografts from CMV-seropositive donors are at risk of CMV disease. Secondary infection by reactivation or superinfection may also lead to CMV disease during immunosuppression,² and HHV-6 reactivates from latency during the first post-transplant months, often together with CMV infection.^{3,4}

These viruses are classified in the β -herpesvirus family. Infection occurs in childhood and then subsequently results in

life-long latency, such that the seroprevalence rate in adults is over 90%.^{5,6} Therefore, in adult solid organ transplant recipients, reactivation of endogenous latent viruses seems to occur very frequently, with reported infection rates of 30–50%.^{7,8} Both viruses can cause several human diseases either as a consequence of reinfection or reactivation of latent infection.^{9,10} CMV is reactivated during periods of stress and cytokine release, which happens in liver transplant recipients, wherein the pharmacologic-induced impairment of the immune response to 'endogenously reactivated' or 'allograft-transmitted' CMV leads to febrile and tissue invasive diseases.^{11,12} HHV-6 reactivation and infections after liver transplantation are asymptomatic, although the risk factors are not completely defined. Nonetheless, clinical syndromes have been associated with HHV-6 infection after liver transplantation, and these have been classified either as direct or indirect effects,^{1,3} so HHV-6 may cause clinically relevant indirect effects such as CMV disease and early fibrosis caused by the recurrence of hepatitis C virus (HCV).^{6,7,14}

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3521 8582; fax: +55 19 3289 1577.

E-mail addresses: ilkaoin@yahoo.com, carliaguardia@yahoo.com.br (I.d.F.S.F. Boin).

Cirrhosis caused by HCV has emerged as a leading indication for liver transplantation.¹⁵ The recurrence of the disease after transplantation is universal and many factors have been associated with it, including CMV infection.¹⁶ The interaction between herpesviruses and HCV has been proposed to be clinically important in HCV-infected liver transplant recipients,¹⁷ including more severe forms of HCV recurrence. Patients with HCV infection have been shown to be more susceptible to infections that are associated with defects in cell-mediated immunity, such as CMV and fungal infections.^{11,18–21}

Our study analyzed the presence of CMV DNA and HHV-6 DNA in liver biopsies from the donor or patients collected at bench surgery and from the post-transplanted period, and correlated these viruses with the occurrence of CMV disease and HCV recurrence.

2. Patients and methods

During the period January 2005 to December 2007, a total of 41 liver transplant patients, transplanted at the Liver Transplant Unit, Clinical Hospital of the State University in Campinas (Unicamp), were enrolled in this study. This was an observational, analytic, longitudinal cohort and prospective study. The following patients were excluded from the study: children and cases of fulminant hepatitis, retransplantation, or death occurring during the first month after transplantation. The 41 patients who were enrolled met the following inclusion criteria: (1) survival in the post-transplantation period for >1 month; (2) indication for at least one liver biopsy post transplantation; (3) sufficient liver biopsy samples for DNA virus analysis by nested PCR method.

The first liver biopsy was collected from the organ at the bench before transplantation (pre-transplant graft biopsy). The other liver biopsies (post-transplant graft biopsies) were collected during the 6-month period after transplantation and when clinically indicated (due to elevated liver enzyme levels). All samples were formalin-fixed and paraffin-embedded until the moment of analysis. They were analyzed by nested PCR for CMV DNA and HHV-6 DNA. Liver biopsies were also monitored for recurrent HCV.

All patients included in this study had been given prophylaxis for herpes simplex infection with 200 mg of acyclovir twice a day for 60 days. The patients with CMV disease were treated intravenously with ganciclovir 5 mg/kg twice a day for 2 weeks.

All recipients and donors had positivity for CMV IgG before transplantation and there was no serology for HHV-6 before transplantation.

All patients underwent standard immunosuppressive therapy based on calcineurin inhibitors: cyclosporine A (CyA; 4–8 mg/kg) and FK506 (0.1 mg/kg) and steroids until the 180th day after the transplant, with tapering and withdrawal. The initial CyA blood level was 200–400 ng/ml in the first 3 months and then 150–250 ng/ml for a further month. The FK506 blood level used was 8–12 ng/ml in the first 3 months and 5–10 ng/ml for a further month.

2.1. Clinical definitions

Hepatitis C recurrence and disease severity were classified with a METAVIR score.²² All HCV liver transplant patients had HCV RNA detected in the serum by conventional molecular methods prior to liver transplantation.^{23–25} We analyzed the presence of CMV DNA and HHV-6 DNA in the same biopsies that were diagnosed with the recurrence of HCV after transplantation.

CMV disease was defined according to previously published criteria⁹ and required the presence of clinical symptoms accompanied by the detection or isolation of CMV in blood by virological tests and/or histological detection in a biopsy specimen.

2.2. Molecular tissue testing

Viral DNA was extracted from the liver biopsies using the Qiagen Tissue Kit (Biotecnologia Brasil, SP, Brazil) in accordance with the manufacturer's instructions, with some modifications performed in our service, and final elution volumes of 30 µL.

2.3. CMV and HHV-6 nested PCR amplification

Five microliters of extracted DNA were used for the nested PCR for CMV and HHV-6 using a mixture containing specific primers for CMV (CMV primers; Invitrogen, São Paulo, Brazil), by the technique previously described, with some modifications,^{26,27} and specific primers for HHV-6 (HHV-6 primers; Invitrogen, São Paulo, Brazil), by the technique previously described, with some modifications.²⁸

The amplifications were carried out on a Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Waltham, MA, USA). The nested PCR product was analyzed under UV light after electrophoresis in agarose gel (Gibco-BRL Life Technology, Carlsbad, CA, USA) in Tris-ethylenediaminetetraacetic acid buffer (TEB) stained with ethidium bromide.

All primer sequences and PCR products were analyzed using the GenBank database before initiating the study. PCR with primers for beta-globin gene amplification was performed on the samples to detect possible false-negative results, which were not included in this study.²⁹

2.4. Statistical analysis

The variables were compared with non-parametric tests (Gamma correlation and Chi-square test or Fisher's exact test). For all tests, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

This study was approved by the Institutional Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences, Unicamp (CEP number 030/2006).

3. Results

Forty-one transplant recipients were studied (32 men and nine women), with a median age of 48 (range 18–67) years. The main indication for the transplant was HCV (16 patients); other indications were HCV and alcohol in 12, cryptogenic cirrhosis in two, Wilson's disease in one, alcoholic liver disease in three, autoimmune hepatitis in two, primary biliary cirrhosis in one, primary sclerosing cholangitis in one, and hepatitis B virus in three.

3.1. CMV DNA and HHV-6 DNA in liver biopsies

Four patients (9.8%) were positive for CMV DNA in pre-transplant graft biopsies. After transplantation three of them remained positive in the post-transplant graft biopsies. From the 37 negative (pre-transplant graft biopsies) only 11 became positive (Table 1) in post-transplant graft biopsies ($p = 0.06$; Fisher's exact test; Table 2).

Fifteen patients (36.6%) were positive for HHV-6 DNA in pre-transplant graft biopsies, and 11 of these patients remained positive in post-transplant graft biopsies. Of the 26 negative patients, 11 became positive (Table 1) for this virus after the transplantation. The patients who were positive for HHV-6 DNA in the pre-transplant graft biopsy had a tendency ($p = 0.05$; Fisher's exact test; Table 2) to remain positive in the post-transplant graft biopsies.

3.2. Herpesvirus infection and CMV disease

CMV disease occurred in 17 of the 41 liver transplantation patients (41.5%), and they were treated with ganciclovir. Two of

Table 1
CMV DNA and HHV-6 DNA monitoring in pre-transplant graft biopsies and post-transplant graft biopsies related with CMV disease and recurrence of HCV

Patient	Pre-transplant biopsy ^a CMV DNA	Pre-transplant biopsy ^a HHV-6 DNA	Post-transplant biopsy ^b CMV DNA	Post-transplant biopsy ^b HHV-6 DNA	CMV disease ^c	HCV recurrence ^d	MIT/VR (HCV-pos)
3 [*]	Negative	Positive	Negative	Positive	Positive	Positive	F1A2
6 [*]	Negative	Positive	Positive	Positive	Negative	Positive	F2A3
12 [*]	Negative	Positive	Negative	Positive	Positive	Positive	F3A2
17 [*]	Negative	Positive	Negative	Positive	Positive	Positive	F2A2
18 [*]	Negative	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	F1A1
20 [*]	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Positive	F3A3
26 [*]	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative	Positive	F2A2
31 [*]	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative	Positive	F1A1
40 [*]	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	F1A3
11 [*]	Negative	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	F2A3
28 [*]	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Positive	F1A2
1 [*]	Negative	Positive	Negative	Negative	Negative	Positive	F1A1
2 [*]	Positive	Positive	Positive	Positive	Negative	Negative	-
5 [*]	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	-
7 [*]	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative	Negative	-
9 [*]	Negative	Negative	Positive	Positive	Positive	Negative	-
10 [*]	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	-
14 [*]	Negative	Positive	Positive	Positive	Positive	Negative	-
15 [*]	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	-
16 [*]	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	-
19 [*]	Positive	Positive	Positive	Positive	Negative	Negative	-
21 [*]	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	-
25 [*]	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	-
29 [*]	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	-
32 [*]	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	-
35 [*]	Negative	Negative	Positive	Positive	Positive	Negative	-
36 [*]	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	-
38 [*]	Positive	Positive	Negative	Negative	Positive	Negative	-
8	Negative	Positive	Positive	Positive	Positive	Negative	-
13	Negative	Positive	Positive	Positive	Positive	Negative	-
24	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	-
33	Negative	Negative	Negative	Negative	Positive	Negative	-
34	Negative	Positive	Negative	Negative	Positive	Negative	-
39	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative	-
41	Negative	Positive	Negative	Negative	Positive	Negative	-
4	Negative	Negative	Negative	Positive	Negative	Negative	-
22	Negative	Negative	Negative	Positive	Negative	Negative	-
23	Negative	Negative	Negative	Positive	Negative	Negative	-
30	Negative	Negative	Positive	Positive	Negative	Negative	-
27	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	-
37	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	-

CMV, cytomegalovirus; HHV-6, human herpesvirus 6; HCV, hepatitis C virus.

^a Pre-transplant graft biopsy: at the bench procedure.

^b Post-transplant graft biopsy: after the transplantation, when clinically indicated according to the liver team.

^c CMV disease: clinical disease treated with ganciclovir.

^d HCV recurrence: recurrence of hepatitis C virus after transplantation.

^{*} Patients were transplanted due to hepatitis C.

the 17 recipients had CMV DNA in pre-transplant graft biopsies and one remained positive in the post-transplant graft biopsy. From the 15 negative patients, six became positive after transplantation (Table 1). We found no significant difference in the presence of CMV DNA in pre-transplant graft biopsies and post-transplant graft biopsies for the patients who had CMV disease (Table 3).

Ten of the 17 patients who had CMV disease were positive in pre-transplant graft biopsies for HHV-6 DNA, of whom seven continued positive after transplantation. From the seven negative in pre-transplant graft biopsies, four became positive in post-transplant graft biopsies (Table 1 and Table 3). This comparison showed a higher CMV disease prevalence among patients who were positive for HHV-6 DNA than among patients who were

Table 2
CMV DNA and HHV-6 DNA monitoring observed in pre-transplant graft biopsies and post-transplant graft biopsies

CMV DNA (n=41)		HHV-6 DNA (n=41)	
Pre-transplant ^a	Post-transplant ^b	Pre-transplant ^a	Post-transplant ^b
4 Positive	3 Positive	15 Positive	11 Positive
37 Negative	1 Negative	4 Negative	4 Negative
	11 Positive	26 Negative	11 Positive
	26 Negative		15 Negative
Fisher's exact test p=0.05		Fisher's exact test p=0.05	

CMV, cytomegalovirus; HHV-6, human herpesvirus 6.

^a Pre-transplant graft biopsy: at the bench procedure.

^b Post-transplant graft biopsy: after the transplantation, when clinically indicated according to the liver team.

Table 3
Comparison of CMV DNA and HHV-6 DNA positivity observed among patients with CMV disease after liver transplantation (n = 17/41).

CMV DNA (n = 17/41)	HHV-6 DNA (n = 17/41)	
	Pre-transplant ^a	Post-transplant ^b
2 Positive	1 Positive 1 Negative Fisher's exact test p = 1.0000	10 Positive 7 Positive 3 Negative Chi-square, p = 0.0128*
15 Negative	6 Positive 9 Negative Chi-square, p = 0.4243	7 Negative 4 Positive 3 Negative Chi-square, p = 0.2325

CMV, cytomegalovirus; HHV-6, human herpesvirus 6.

^a Pre-transplant graft biopsy: at the time of procedure.

^b Post-transplant graft biopsy: after the transplantation, when clinically indicated according to the liver team.

* Statistically significant.

Table 4
Comparison of CMV DNA and HHV-6 DNA post-transplant^a positivity among patients with recurrent hepatitis C virus.

	HCV hepatitis C liver recipients (n = 28)	
	Recurrent HCV (n = 12)	Without recurrent HCV (n = 16)
CMV DNA		
Positive	4	6
Negative	8	10
	Fisher's exact test p = 1.000	
HHV-6 DNA		
Positive	9	6
Negative	3	10
	Fisher's exact test p = 0.049 ^b	

CMV, cytomegalovirus; HHV-6, human herpesvirus 6; HCV, hepatitis C virus.

^a Post-transplant graft biopsy: after the transplantation, when clinically indicated according to the liver team.

^b Statistically significant.

negative for HHV-6 DNA in pre-transplant graft biopsies (p = 0.013; Chi-square test).

Twenty-four recipients did not have CMV disease and just five were positive in pre-transplant graft biopsies for HHV-6 DNA.

3.3. Herpesvirus infection and recurrent hepatitis C

In our study 28 (68.3%) of the patients were transplanted due to hepatitis C, and 12 (42.9%) of them had recurrence of the virus after the transplant. A METAVIR score was applied to all patients with HCV recurrence (Table 1).

We observed that four of the 12 (33.3%) patients with recurrence had CMV DNA positivity in post-transplant graft biopsies; we did not verify any correlation between the presence of CMV DNA in post-transplant graft biopsies and the same biopsies with HCV recurrence (p = 1.00; Fisher's exact test; Table 4).

When we analyzed the correlation between the presence of HHV-6 DNA in post-transplant graft biopsies and HCV recurrence, we found nine of the 12 (75%) recipients to be positive in post-transplant graft biopsies, and six of the nine had already been positive in pre-transplant graft biopsies (Table 1). After the statistical analyses we observed that the nine patients who were positive for the HHV-6 DNA developed more HCV recurrence (p = 0.049; Fisher's exact test; Table 4).

4. Discussion

Some previous studies have suggested that CMV and HHV-6 infections are frequent in liver transplant recipients in our Liver Transplant Unit (Unicamp)^{8,20,21} CMV, HHV-6, and HHV-7 infections are common after liver transplantation, and the interaction of these viruses can increase their pathogenic

effects.^{22,23} Overall, the incidence of HHV-6 infection after liver transplantation reported in the literature varies from 14% to 82%.²² Thomasini et al. detected 65% positivity for CMV DNA in blood samples from liver transplanted patients by nested PCR.²⁴

In our study, the presence of CMV DNA was observed in 9.8% and the presence of HHV-6 DNA in 36.6% of pre-transplant graft biopsies. We could find no published data to confirm these data and no similar data, but it is known that these viruses can have an incidence over 80% (serologic status) in the human population.^{17,24} The same results were obtained by Costa in Brazil.²⁵ This is an important factor because the herpesviruses can establish a latent infection for the lifetime of the host and reactivate later.²⁶

A recent study carried out in patients who underwent liver transplantation at the Hospital de Clínicas, State University of Campinas (Unicamp) showed CMV positivity (IgG) in 94.7% of patients before transplantation. They related the importance of serological investigations and diagnostic examinations before the transplantation procedure, seeking to minimize possible reactivation of the disease after the use of immunosuppressive drugs, particularly in the first 6 months after transplantation, or even to avoid a primary infection.²⁷

In our study, most biopsies remained positive after transplantation showing us that the presence of CMV DNA and HHV-6 DNA in pre-transplant graft biopsies had a tendency to remain positive after the transplantation. The literature on tissue viral load is mostly limited to CMV and HHV-6, especially in relation to biopsies pre and post transplantation. However, in a study by Sebelová et al., in which herpesviruses were detected in the allograft biopsies by PCR, the HHV-6 DNA was the most commonly found. A qualitative tissue PCR may also detect latent or chromosomally integrated HHV-6 sequences, not necessarily an indicator of active infection, but positive intragraft HHV-6 antigens represent protein synthesis suggesting that HHV-6 may persist in the allograft in a manner similar to its close relative CMV.^{28,29} This confirms previous studies, in which patients with pre-transplant HHV-6 evidence also showed HHV-6 antigens in the post-transplant biopsies.⁴⁰

Molecular assays are the most commonly used laboratory methods to detect herpesvirus reactivation and replication after transplantation. Both quantitative and qualitative methods have been developed to detect CMV DNA and HHV-6 DNA in blood samples, biopsy and tissue specimens. The polymerase chain reaction allows for amplification of regions of the genome to be studied from small amounts of DNA and is therefore a method of choice for use in tissues fixed in formalin and embedded in paraffin.⁴¹ Research in older tissue samples preserved in paraffin requires the use of primers that generate products with fewer base pairs.⁴²

Seventeen (41.5%) of our 41 recipients developed the CMV disease. Although it is estimated that 25% of all liver transplant recipients will develop CMV disease²² because of the lack of a pre-existing CMV-specific immunity, CMV-seronegative recipients of a

liver allograft from CMV-seropositive donors (CMV D + /R-) are at the highest risk of CMV disease and its complications.^{43,44} However, all patients had CMV IgG positive serology in the pre-transplant period and none had a serological status for HHV-6.

Ten of the 17 recipients who had CMV disease showed HHV-6 DNA in pre-transplant graft biopsies and they continued positive after transplantation, although the CMV DNA in pre-transplant graft biopsies did not have a significant relationship with CMV disease.

Fitzgerald et al. demonstrated that the CMV serologic status of the donor and recipient are the most important factors in determining the development of severe CMV disease and consequently the downstream effect on the transplanted organ.⁴⁵

There was a statistically significant difference in the presence of HHV-6 DNA in pre-transplant graft biopsies between recipients who showed and did not show CMV disease after liver transplantation ($p < 0.0128$). This indicates that a pre-transplant HHV-6 infection may be a risk factor for CMV after transplantation. This is because the indirect effects attributed to HHV-6 include an exacerbation of CMV disease, an increased severity of HCV recurrence, and an increased risk of other opportunistic infections, allograft dysfunction, and acute cellular rejection. It is very common to have a high prevalence of this virus in the population, but its presence and replication in the tissue can be intensified after transplantation and increase its replication.^{17,19,46–48}

Most of our patients had an indication for liver transplant due to liver cirrhosis caused by HCV. The recurrence of hepatitis C occurred in 12 of the 28 (42.9%) recipients; nine of 12 (75%) showed HHV-6 DNA in post-transplant graft biopsies and six of these were positive in pre-transplant graft biopsies. Thirty-three percent were positive for CMV DNA in post-transplant graft biopsies.

The recurrence of HCV is nearly universal and leads to chronic hepatitis in 20–40% of recipients after liver transplantation.⁴⁹ Also, an interaction between herpesvirus and HCV has been proposed to be clinically important in HCV-infected liver transplant recipients.^{9,24,25}

Our results demonstrated that the presence of HHV-6 DNA in patients who developed HCV recurrence was significant ($p = 0.049$), differing from those patients who did not have HHV-6 DNA in their post-transplant graft biopsies; this showed that these viruses may facilitate HCV recurrence. Previous studies have shown that CMV and HHV-6 have immunomodulatory effects, and have suggested more rapid progression of HCV in liver transplant recipients co-infected with this virus.^{9,24,25,50} Nevertheless, in our study the incidence of CMV DNA was not significant when compared to the HCV recurrence after liver transplantation, and there was also no association with fibrosis score ($p = 0.4$).

In another study involving 66 liver transplantation patients with HCV infection, no correlation was observed between HHV-6, CMV, and HCV viral loads, although more severe degrees of fibrosis and hepatitis were seen in patients with CMV disease and HHV-6 infection.¹⁷ Given our small recurrence group, it was perhaps not possible to identify an association with the fibrosis score.

We found that most of our patients with recurrence had HHV-6 DNA. This was also found in the study by Singh et al., which reported that HCV-positive patients who developed HHV-6 viremia after liver transplantation had an earlier recurrence and a higher fibrosis score upon hepatitis C recurrence when compared to patients without viremia.¹⁸ However, our study showed that HHV-6 DNA was already present in pre-transplant graft biopsies.

Chronic HCV infection does not appear to cause herpesvirus reactivation or replication, reinforcing the hypothesis of previous studies that herpesvirus infections bring about HCV replication, accelerating the progression of liver disease due to HCV.⁵¹ Although there is no definitive evidence that HHV-6 is involved

in direct clinical manifestations after liver transplantation, associations with indirect effects previously attributed to it have been demonstrated.⁵²

In summary, most of the recipients with HHV-6 DNA in pre-transplant graft biopsies remained positive after transplantation, showing a possible risk for post-transplant allograft loss, because there was an association between HHV-6 and recurrent HCV and CMV disease. However, further studies are necessary to clarify these data, especially HHV-6 infection in donor samples, which are well known to have a negative impact on transplant outcome. This issue is under investigation by our group.

Acknowledgements

We thank Sergio P. Magalhães (State University of Campinas, Brazil) for help in cutting the biopsies and thank all members of the Diagnosis of Molecular Infection Disease Laboratory, State University of Campinas, São Paulo, Brazil. This study was funded by Capes-Brazil. This study was approved by the Institutional Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences, Unicamp (CEP number 030/2006).

Conflict of interest: No conflicts of interest to declare.

References

- Kumar S, Blair JE. Viral and fungal infections after liver transplantation—part II. *Liver Transpl* 2006;12:2–11.
- Singh N, Wamsteker C, Reyes I, Wagener MM, de Vera M, Gacenielli TV, et al. Impact of evolving trends in recipients and donor characteristics on cytomegalovirus infection in liver transplant recipients. *Transplantation* 2004;77:106–10.
- Lautenschlager I, Lappalainen M, Linnavaara K, Soti J, Hockemuhl K. CMV infection is totally associated with concurrent HHV-6 and HHV-7 antigenemia in liver transplant patients. *J Clin Virol* 2002;25(Suppl 2):S57–61.
- Helant et al., Logvinov R, Nikkunen P, Lautenschlager I. Detection of HHV-6 antigens in biopsies of kidney transplant recipients with cytomegalovirus infection. *Transpl Int* 2008;21:900–4.
- Cervoni C, Marini MA, Litnans L, Rogg E, Sento N, Pumaella T, et al. A prospective study of human herpesvirus-6 primary infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2006;82:979–82.
- Yamanishi K. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman BR, editors. *Fields virology*. Philadelphia PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p. 2705–801.
- Razonable RR, Brown RA, Hamar A, Covington E, Alcock E, Pava CV, et al. Herpesvirus infections in solid organ transplant patients at high risk of primary cytomegalovirus disease. *J Infect Dis* 2005;192:1331–9.
- Sampaio AM, Theodoro 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;43:1357–9.
- Ljunggren P, Griffiths P, Pava C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002;34:1094–7.
- Kotton CN, Hamar D, Caliendo AM, Averbach A, Chou S, Snydman DR, et al. Transplantation Society International CMV Consensus Group. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* 2010;89:779–95.
- Razonable RR, Emery VC. Management of CMV infection and disease in transplant patients. *Herpes* 2004;11:77–86.
- Razonable RR, Pava CV. Herpesvirus infections in transplant recipients: current challenges in the clinical management of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections. *Herpes* 2003;10:60–5.
- Razonable RR, Lautenschlager I. Impact of human herpes virus 6 in liver transplantation. *World J Hepatol* 2010;2:345–53.
- Razonable RR, Zerr DM. HHV-6, HHV-7 and HHV-8 in solid organ transplant recipients. *AST Infectious Diseases Community of Practice. Am J Transplant* 2009;9:97–100.
- Bizzoni T, Dacef C, Trepo C, Muller D. Hepatitis C virus recurrence after liver transplantation. *Gut* 1998;44:575–8.
- Barak RW, Krenner WK, Satts KP, Wiesner M, Rosen CB, Razonable RR, et al. Impact of cytomegalovirus infection, year of transplantation, and donor age on outcomes after liver transplantation for hepatitis C. *Liver Transpl* 2002;8:362–9.
- Hamar A, Kamat D, Rabouf J, Caliendo AM, Moosa G, Luy G, et al. Interactions between cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and the recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Am J Transplant* 2002;2:461–6.
- Razonable RR, Barak RW, van Cuijck H, Brown RA, Chertoff M, Smith TP, et al. The pathogenesis of hepatitis C virus is influenced by cytomegalovirus. *Clin Infect Dis* 2002;35:974–81.
- Singh N, Hassan S, Campgan DM, Koox SK, Weick KE, Wagener MM, et al. Impact of human herpesvirus-6 on the frequency and severity of recurrent hepatitis C virus hepatitis in liver transplant recipients. *Clin Transplant* 2002;16:52–6.

20. Boeckh M, Nichols WC. Immunosuppressive effects of beta-herpesviruses. *Herpes* 2003;10:12–6.
21. El-Serag HB, Anand B, Richardson P, Rabenack L. Association between hepatitis C infection and other infectious diseases: a case for targeted screening? *Am J Gastroenterol* 2003;98:167–74.
22. Bedossa P, Petyand T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24:289–93.
23. Brad AJ, Donagan E, Lake J, Ferrelli L, Galbraith C, Ramirez IS, et al. Hepatitis C in patients undergoing liver transplantation. *Ann Intern Med* 1991;114:202–4.
24. Gayowski T, Singh N, Martin RL, Varga J, Wagener M, Wernstedt C, et al. Hepatitis C virus genotypes in liver transplant recipients: impact on post-transplant recurrence, infections, response to interferon-alpha therapy and outcome. *Transplantation* 1997;64:422–6.
25. Donnet VJ, Gerber M, Hoshnaghi JH, Menna M, Schurr J. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994;19:1513–20.
26. Shibata D, Martin WJ, Applbaum MD, Casary DM, Leedom JM, Amheim N. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1988;158:1185–92.
27. Demmeler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, May RA. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infect Dis* 1988;158:1177–84.
28. Sorliano F, Carrigan DR, Amano Y, Benedetti L, Crowley RW, Krawoff AL, et al. Detection of human herpesvirus 6 in plasma of children with primary infection and immunosuppressed patients by polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1995;171:273–80.
29. Aquino VM, Figueiredo IT. Cytomegalovirus infection in renal transplant recipients diagnosed by nested-PCR. *Braz J Med Biol Res* 2001;34:93–101.
30. Costa FA, Soti MN, Andrade PD, Bonon SH, Thomazini 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 (Sao Paulo)* 2011;66:949–53.
31. 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.
32. Abdel Massih RC, Razonable JL. Human herpesvirus 6 infections after liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2009;15:2561–9.
33. Thomazini RL, Sampaio AM, Bonon SH, Bonin IF, Leonardi IS, Leonardi M, et al. Detection and monitoring of human herpesvirus 7 in adult liver transplant patients: impact on clinical course and association with cytomegalovirus. *Transplant Proc* 2007;39:1537–9.
34. Krueger GH, Klappenberg U, Hoffmann A, Abiadhi DV. Clinical correlates of infection with human herpesvirus-6. *In Vivo* 1994;8:457–516.
35. Costa SC. Infecção por citomegalovirus (CMV): epidemiologia, diagnóstico e tratamento. *Rev Bras Clin Ter* 1999;25:18–20.
36. De Bolle L, Naeyaert L, De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:217–49.
37. Boim ID, Boton VL, Stachi RS, Pereira MI, Portugal TC, Lido EY. Serological profile of pretransplantation liver patients. *Transplant Proc* 2010;42:491–3.
38. Seboková K, Feber J, Carpenter B, Shaw L, Kamaschaw T, Diaz-Mitoma F, et al. Tissue viral DNA is associated with chronic allograft nephropathy. *Pediatr Transplant* 2005;9:598–603.
39. Ward RN, Leung HN, Nacheva SP, Howard J, Adkinson GE, Davies NW, et al. Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles. *J Clin Microbiol* 2006;44:1571–4.
40. Hämälä M, Hückelstedt K, Krögerus L, Lautenschlager L. Pretransplant human herpesvirus 6 infection of patients with acute liver failure is a risk factor for posttransplant human herpesvirus 6 infection of the liver. *Transplantation* 2006;81:367–72.
41. Coates PJ, d'Ardenne AJ, Khan G, Kangro HO, Slavov G. Simplified procedures for applying the polymerase chain reaction to routinely fixed paraffin wax sections. *J Clin Pathol* 1991;44:115–8.
42. Geier CE, Lund JK, Mancos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR Methods Appl* 1991;1:45–50.
43. Anthony SK, Eid AJ, Pedersen RA, Kemmer WK, Goico IC, Patel R, et al. Delayed-onset primary cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Liver Transpl* 2007;13:1703–9.
44. Pava C, Hamar A, Dominguez E, Washburn K, Steinberg E, Alexander B, et al. Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2004;4:611–20.
45. Fitzgerald JT, Galley B, Tacento SE, McVicar JP, Trappmann C, Chen X, et al. Pretransplant recipient cytomegalovirus seropositivity and hemodialysis are associated with decreased renal allograft and patient survival. *Transplantation* 2004;77:1405–11.
46. Hämälä M, Hückelstedt K, Hyytiäinen O, Lautenschlager L. HHV-6 and HHV-7 antigenemia related to CMV infection after liver transplantation. *J Med Virol* 2006;78:900–5.
47. Razonable JL, Pava CV. Infectious and allograft rejection-intent versus complications of organ transplantation. *Swiss Med Wkly* 2005;135:571–3.
48. Griffiths PD, Al-Jabali M, Saeed CP, Clark DA, Quaglia A, Davies SE, et al. Human herpesviruses 6 and 7 as potential pathogens after liver transplant: prospective comparison with the effect of cytomegalovirus. *J Med Virol* 1998;59:496–501.
49. Wiesner RH, Sorrell M, Millam F. Report of the first International Liver Transplantation Society expert panel consensus conference on liver transplantation and hepatitis C. *Liver Transpl* 2003;9:1–9.
50. Rosen HR, Chou S, Gofless GJ, Greth DR, Flota KD, Bonadonna A, et al. Cytomegalovirus viremia: risk factor for allograft cholestasis after liver transplantation for hepatitis C. *Transplantation* 1997;64:721–6.
51. Hamar A, Washburn K, Freeman R, Pava CV, Mousa H, Alcock E, et al. An assessment of interactions between hepatitis C virus and herpesvirus reactivation in liver transplant recipients using molecular surveillance. *Liver Transpl* 2007;13:1422–7.
52. Lee SO, Brown RA, Razonable JL. Clinical significance of pretransplant chromosomally integrated human herpesvirus-6 in liver transplant recipients. *Transplantation* 2011;92:234–9.