

DÉBORA DE CAMPOS DIEAMANT

**DIAGNÓSTICO E GENOTIPAGEM DE
CITOMEGALOVÍRUS HUMANO (HCMV) EM
RECEPTORES PEDIÁTRICOS DE TRANSPLANTE DE RIM
OU CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS**

CAMPINAS

2006

DÉBORA DE CAMPOS DIEAMANT

**DIAGNÓSTICO E GENOTIPAGEM DE
CITOMEGALOVÍRUS HUMANO (HCMV) EM
RECEPTORES PEDIÁTRICOS DE TRANSPLANTE DE RIM
OU CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Mestre em Farmacologia*

ORIENTADORA: Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

D562d Dieamant, Débora de Campos
Diagnóstico e genotipagem de citomegalovírus humano (HCMV)
em receptores pediátricos de transplante de rim ou células tronco
hematopoética / Débora de Campos Dieamant. Campinas, SP : [s.n.],
2006.

Orientador : Sandra Cecília Botelho Costa
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Citomegalovirus. 2. Reação em cadeia de polimerase. 3. Rins -
Transplante. 4. Transplante de células – Tronco hematopoéticas. I.
Costa, Sandra Cecília Botelho. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em ingles : Diagnosis and genotyping of Human Cytomegalovirus in
renal or hematopoetic stem cell pediatric transplant recipients**

Keywords: • Cytomegalovirus

- Nested PCR
- Kidney transplantation
- Haematopoetic stem cell transplantation

Titulação: Mestrado em Farmacologia

**Banca examinadora: Prof Dr Sandra Cecília Botelho Costa
Prof Dr Afonso Celso Vigorito
Prof Dr Fernando Lopes Alberto**

Data da defesa: 23-08-2006

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

MEMBROS:

1- Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

2- Prof. Dr. Afonso Celso Vigorito

3- Prof. Dr. Fernando Lopes Alberto

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 23/08/2006

DEDICATÓRIA

*Àquela pessoa que sempre dedicarei tudo o que faço,
pois nunca conseguirei retribuir o que faz por mim.*

Minha mãe, Edna

*Àquela pessoa de quem muito herdei e soube,
mesmo em silêncio me confortar.*

Meu pai, Rui

*Aquelas pessoas que sempre me acompanham,
mas pela distância e falta de tempo nunca agradeço*

Meus irmãos, Gustavo e Felipe

*Àquela pessoa que chegou ao mundo em tão pouco tempo,
mas pelo qual já sinto amor incondicional*

Meu sobrinho, Enzo

*Àquele que me dá força para alcançar meus objetivos
e está sempre caminhando junto comigo*

meu namorado, Miguel

Á Prof^a. Dr^a. Sandra Cecília Botelho Costa, pela orientação deste trabalho, mas principalmente pela confiança, compreensão, amizade e incentivo

Á Deus, dedico este trabalho e agradeço por Ele fazer parte da minha vida e por ter colocado no meu caminho amigos nos quais encontrei apoio e incentivo para poder prosseguir

Aos meus tios, tias, primos e primas pelo apoio e força para continuar.

À amiga Carla, pela amizade, companheirismo, bom humor e pela companhia nas viagens.

À Sandra Bonon que sempre esteve presente para ajudar e socorrer nos momentos difíceis, acalmando nos momentos de tensão e aconselhando, com sabedoria, nos momentos de dúvida...Muito obrigada

Às amigas do laboratório Telma, Daniela, Bruna, Cristiane e Juliana e o amigo Ronaldo pela vezes que me ajudaram (que foram muitas) para que eu pudesse concluir este trabalho.

A minha cunhada, Carina que sempre me escutou nas horas em que eu precisava apenas de um ouvinte e me apoio nas minhas decisões.

À Dulcinéia que não hesitou em me ajudar, em especial na genotipagem.

Aos amigos da A Framacotécnica, que acompanharam este trabalho o tempo todo e sei que torcem por mim.

À Dra. Liliane e Dra. Érika pela oportunidade e confiança, principalmente pelas “portas” que me abriram tão amistosamente...Muito obrigada

À Lucy pela paciência e dedicação.

À minhas amigas Carolina, Aline e Vaniele pelos momentos de diversão e por estarem sempre torcendo por mim.

A todos que de alguma forma participaram desta vitória, meu muito obrigada. Todos, por algum motivo, estiveram presentes nos momentos certos.

A todos os pacientes receptores pediátricos de transplante de rim medula óssea, cuja colaboração foi fundamental para sua conclusão.

"A vida é como jogar uma bola na parede:
Se for jogada uma bola azul, ela voltará azul;
Se for jogada uma bola verde, ela voltará verde;
Se a bola for jogada fraca, ela voltará fraca;
Se a bola for jogada com força, ela voltará com força.
Por isso, nunca "jogue uma bola na vida"
de forma que você não esteja pronto a recebê-la.
A vida não dá nem empresta;
não se comove nem se apieda.
Tudo quanto ela faz é retribuir e
transferir aquilo que nós lhe oferecemos"

Albert Einstein

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	<i>xxxvii</i>
ABSTRACT.....	<i>xliii</i>
1- INTRODUÇÃO.....	49
1.1- Histórico.....	51
1.2- Características Biológicas do Citomegalovírus Humano.....	52
1.2.1- Classificação.....	52
1.2.2- Estrutura Viral.....	53
1.2.3- Fisiopatologia.....	54
1.3- Mecanismos de Replicação e Regulação Gênica do HCMV.....	54
1.4- Características Físico-Químicas.....	58
1.5- Epidemiologia e Transmissão.....	58
1.6- Patogênese.....	61
1.7- Manifestações Clínicas.....	61
1.8- Infecção por HCMV em Pacientes Transplantados Pediátricos.....	64
1.9- Diagnóstico Laboratorial.....	65
1.9.1- Métodos Convencionais.....	65
1.9.1.1- Microscopia Eletrônica.....	65

1.9.1.2- Exames Histopatológicos e Citológicos.....	65
1.9.1.3- Isolamento Viral por Cultura Clássica.....	66
1.9.1.4- Métodos Sorológicos.....	66
1.9.2- Métodos Modernos.....	66
1.9.2.1- Técnica da “Shell Vial”	67
1.9.2.2- Antigenemia.....	68
1.9.2.3- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	69
1.10- Linhagens de HCMV.....	71
1.10.1- Glicoproteína B.....	72
1.11- Agentes antivirais com atividade contra HCMV.....	74
1.11.1- Imunoglobulina endovenosa.....	74
1.11.2-Ganciclovir.....	74
1.11.3- Foscarnet.....	76
1.11.4- Cidofovir.....	77
2- OBJETIVOS.....	79
3- CASUÍSTICA.....	83
3.1- Diagnóstico de infecção ativa por HCMV.....	85
3.2- Genotipagem.....	85
4- MÉTODOS.....	89

4.1- Antigenemia.....	91
4.1.1- Extração de leucócitos polimorfonucleares do sangue periférico.....	91
4.1.2- Preparação das lâminas.....	92
4.1.3- Coloração das lâminas.....	92
4.1.4- Leitura e interpretação da lâminas.....	93
4.2- Nested-PCR.....	94
4.2.1- Extração do DNA.....	94
4.2.1.1- Lise de Leucócitos.....	94
4.2.2- Amplificação gênica do HCMV pela PCR.	95
4.2.2.1- Condições da reação.....	95
4.2.2.1.1- Iniciadores externos.....	95
4.2.3- Reamplificação do genoma do HCMV pela Nested-PCR.....	96
4.2.4- Cuidados especiais utilizados para evitar contaminação.....	99
4.3- Identificação das linhagens de HCMV.....	99
4.3.1- Condições da reação.....	99
4.3.2- Detecção.....	101
4.3.3- Análise de restrição.....	101
4.4- Critérios para definição e infecção ativa por HCMV.....	102
4.5- Critérios para definição de doença por HCMV.....	103

4.6- Critérios para definição de recorrência de infecção ativa por HCMV.....	104
4.7- Critérios para definição de infecção ativa/doença tardia por HCMV.....	104
5- RESULTADOS.....	105
5.1- Infecção ativa pelo HCMV.....	107
5.2- Análise do Status sorológico.....	109
5.3- Tempo de início de detecção da infecção ativa pelo HCMV.....	110
5.4- Diagnóstico da infecção ativa pelo HCMV detectada por antigenemia.....	111
5.5- Diagnóstico da infecção ativa pelo HCMV por Nested-PCR.....	113
5.6- Nested-PCR para amplificação do gene da glicoproteína B.....	114
5.7- Avaliação da relação entre genótipo e a clínica.....	117
6- DISCUSSÃO.....	119
7- CONCLUSÕES.....	127
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
9- ANEXOS.....	149

HCMV	Citomegalovírus
AD169	Linhagem de HCMV isolada em laboratório
HHV-5	Herpes Vírus Humano tipo 5
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Kb	Kilobases
Pb	Pares de bases
Kpb	Kilo pares de bases
U_L	Seqüência única longa (“Unique Long”) do genoma do HCMV
U_S	Seqüência única curta (“Unique Short”) do genoma do HCMV
IR_L/IR_S	Seqüências invertidas repetidas do genoma do HCMV (“inverted Repeats”)
TR_L/TR_S	Seqüências de terminações repetidas do genoma do HCMV (“Terminal Repeats”)
IE	Período de expressão gênica “Immediate Early” – imediatamente precoce
E	Período de expressão gênica “Early” – precoce
L	Período de expressão gênica “Late” – tardia
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensageiro

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
TMO	Transplante de Medula Óssea
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay” – teste sorológico imunoenzimático
Fc	Porção da molécula da imunoglobulina
pp65	Proteína matricial de peso molecular 65 kD
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Mab	Anticorpo Monoclonal
gB e gH	Glicoproteínas do envelope do HCMV
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism” – Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
SSCP	“Single Strand Conformation Polymorphism” – Polimorfismo de conformação de fita simples
GVHD	Doença de enxerto contra o hospedeiro
PBL	Leucócitos do sangue periférico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
rpm	Rotação por minuto
M	Molar

Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
dH₂O	Água destilada, deionizada e estéril
ml	Mililitros
mM	Milimolar
pmol	Picomoles
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
μl	Microlitros

	<i>Pág.</i>
Tabela 01- Características gerais dos pacientes estudados.....	87
Tabela 02- Seqüências dos “primers” para amplificação da região MIE do HCMV.....	96
Tabela 03- Seqüências dos “primers” para amplificação a região IE do HCMV....	96
Tabela 04- Seqüências dos “primers” para amplificação da região do gene da Beta Globina.....	97
Tabela 05- Seqüência dos "Primers" para aplificação das regiões gB do HCMV.....	100
Tabela 06- Resumo dos resultados obtidos da infecção ativa por HCMV.....	108
Tabela 07- Relação Infecção ativa por HCMV com status sorológico.....	109
Tabela 08- Resumo do índice de infecção ativa, doença e óbito por HCMV baseado nos status sorológicos do doador e do receptor.....	110
Tabela 09- Mediana do tempo do início da infecção ativa por HCMV.....	111
Tabela 10- Incidência de infecção ativa por HCMV diagnosticada por antigenemia.....	112
Tabela 11- Avaliação do número de células-positivas em relação à doença por HCMV.....	112
Tabela 12- Concordância entre AGM e PCR.....	114
Tabela 13- Distribuição dos genótipos na população estudada com infecção ativa pelo HCMV.....	115
Tabela 14- Distribuição dos genótipos encontrados nas misturas de linhagens.....	116
Tabela 15- Relação entre o genótipo e o quadro clínico.....	117

	Pág.
Figura 01- Estrutura do Citomegalovírus Humano (HCMV).....	53
Figura 02- Organização do Genoma do HCMV.....	54
Figura 03- Mecanismo de infecção do HCMV nas células do hospedeiro.....	57
Figura 04- Cultura pela técnica da “Shell Vial”.....	68
Figura 05- Amplificação gênica por PCR.....	71
Figura 06- Estrutura química do Ganciclovir.....	75
Figura 07- Reação de imunoperoxidase (antigenemia)	94
Figura 08- Amplificação da região IE do HCMV e da Beta-Globina Humana.....	98
Figura 09- Padrões da digestão (gB)	102
Figura 10- Amplificação da região da Glicoproteína B do HCMV.....	114

LISTA DE GRÁFICOS

	<i>Pág.</i>
Gráfico 01- Resultados do testes laboratoriais pra diagnóstico de infecção ativa por HCMV.....	111
Gráfico 02- Distribuição dos genótipos do HCMV.....	116



RESUMO

A partir de 1960, com a evolução nos processos cirúrgicos para transplante, a infecção pelo HCMV começa a ser reconhecida como uma doença de importância clínica, sendo considerado o principal agente patogênico em hospedeiros com o sistema imunológico comprometido. Foi iniciada, em 1980, a utilização de medidas para o controle do vírus com agentes antivirais e intervenções imunológicas, e atualmente, os avanços para a compreensão dessa virose estão relacionados aos aspectos moleculares da infecção e controle clínico, principalmente nos grupos de risco.

Sabendo-se da importância do diagnóstico precoce da infecção ativa e da identificação das linhagens de HCMV em pacientes transplantados por sua possível relação com a infectividade e apresentação clínica, este trabalho teve como objetivos principais:

(1)Diagnosticar e monitorizar a infecção ativa por HCMV em receptores pediátricos de transplante de rim ou medula óssea em seguimento no Hospital de Clínicas da UNICAMP e no Centro Infantil Boldrini;(2)Determinar a prevalência dos subtipos gB de HCMV na população estudada;(3)Avaliar a relação de uma determinada linhagem com o quadro clínico, apresentado pelos pacientes estudados, durante a infecção ativa e doença por HCMV.

Para o diagnóstico da infecção ativa por HCMV, foram analisadas amostras de sangue de 42 pacientes transplantados pediátricos, atendidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP e Centro Infantil Boldrini, com idade entre 2 a 18 anos, sendo que 19 deles eram receptores de transplante renal e os outros 23, receptores de transplante de medula óssea. Foram utilizadas técnicas rápidas e precoces de diagnóstico: Antigenemia e Nested-PCR

A identificação das diferentes cêpas do HCMV foi feita a partir do DNA de pacientes que apresentaram antigenemia e/ou 2 “Nested PCR” consecutivos positivos para a região IE do vírus.

Para a genotipagem também foi utilizada a Nested-PCR para a amplificação da glicoproteína B seguida da análise de restrição com as enzimas *Rsa I* e *Hinf I* para que fosse possível a identificação da linhagem viral.

A infecção ativa por HCMV foi diagnosticada em 20 (47,6%) dos 42 pacientes estudados, sendo 5/20 (21,7%) receptores de células tronco hemeatopoética e 15/20 (79%) receptores de transplante de rim. Deste pacientes que apresentaram infecção ativa pelo HCMV fizemos a genotipagem através de uma amostra positiva de sangue. Para os pacientes que apresentaram recorrência da infecção (5/20) a análise do genótipo viral foi feita nos dois períodos da infecção, caracterizando, em todos os casos, reativação viral. Como resultados da genotipagem tivemos uma prevalência do genótipo 1, encontrado em 45% (9/20) dos pacientes infectados pelo HCMV, sendo 7/15 receptores de rim e 2/5 receptores de células tronco hemetopoéticas. O Genótipo 2 também teve uma frequência considerável entre este pacientes apresentando uma prevalência de 25% (5/20) e sugeriu estar relacionado com um quadro clínico mais grave e reativação viral após tratamento. A mistura de linhagens também foi encontrada em 30% (6/20) dos pacientes estudados, gB1gB2 (3/6), gB1gB4 (2/6) e gB2gB3 (1/6). Os pacientes que apresentaram como linhagem viral a mistura de linhagens apresentaram melhor prognóstico da infecção ativa pelo HCMV. Os genótipos 3 e 4 não foram encontrados isoladamente em nenhuma amostra genotipada dos pacientes estudados.



ABSTRACT

Human cytomegalovirus (HCMV) remains the most important cause of serious viral infections in pediatric transplant recipients. In these patients, early diagnosis of active HCMV infection is important since the development of HCMV disease may be prevented. Ganciclovir has been established as an effective treatment agent for active infection by HCMV.

HCMV disease can occur from infection acquired by the transplanted organ or from re-activation of latent infection. The risk is highest within 2 months of transplantation. Several risk factors for disease have been identified and include: HCMV-positive donor, HCMV-negative recipient, lack of anti-viral prophylaxis, and receipt of cadaveric kidney or type of bone marrow transplant. Intense immunosuppression has also been implicated. For discriminate patients with active infection from those without such infection, tests that include the pp65 antigenemia assay (AGM) and DNA detection methods are describe. The polymerase chain reaction (PCR) is a sensitive method for detection of HCMV DNA and active infection. The HCMV antigenemia assay is a rapid and quantitative method widely used as a guideline for starting treatment with ganciclovir. Genetic variability of functionally important genes among different virus strains may influence clinical manifestations of HCMV infections. These variabilities, mainly of the glycoprotein B (gB) gene of the viral envelope, appear to be of clinical relevance because they are assumed to play an essential role in the induction of immune response and in viral entry into host cells, and it has been considered as a potential marker for viral virulence. Based on the restriction analysis of PCR products (PCR-RFLP), the HCMV genotypes were determined previously, and it may possibly be helpful in predicting the clinical outcome of HCMV infection. The aim of this study were detect and monitoring active HCMV infection in pediatric patients recipients of renal or bone marrow transplantation using DNA detection and antigenemia tests and to study the prevalence of subtypes gB-HCMV in this patients and the clinical impact.

Twenty patients (47.6%) were infected during the monitoring with N-PCR and/or AGM. Recurrent infection occurred in five out of 20 patients(25%). One of these patient (20%) had done bone marrow transplantation and four patients (80%) had renal transplant.

The median time of the recurrent infection was 122 days (89-134). The patients that received ganciclovir prophylaxis had active HCMV infection and probable HCMV disease.

Fourteen out of 20 patients (70%) developed probable HCMV disease. Three out of (21.4%) these patients were recipients of bone marrow transplantation and eleven (78.6%) were recipients of renal transplant. The symptoms more frequent in these patients were fever, diarrhea and vomit. This symptoms associate with active HCMV infection were considered probable HCMV disease.

Nested-PCR amplification and restriction enzyme digestion of the HCMV gene were performed in 20 patients with active HCMV infection and results in differentiation of four digestion patterns as previously demonstrated (Chou and Dennison, 1991). The genotypes founds were: nine patients (45%) were compatible with the gB1 genotype; five (25%) were gB2 and six patients were mixture of gB types. In the patients that demonstrated mixture of gB types, 3 (50%) were compatible with the gB1gB2; two (33.3%) were compatible with gB1gB4 and one (16.7%) were compatible with gB2 gB3. No found isolated gB3 and gB4 genotype in the patients studied.



1- INTRODUÇÃO

1.1- Histórico

A primeira fase da história do conhecimento sobre citomegalovírus humano (HCMV) foi originada exclusivamente de dados obtidos através de estudos histopatológicos. O HCMV foi designado como agente etiológico da “Doença de Inclusão Citomegálica” e cuja denominação derivou-se do efeito citopático característico, representado pelo aumento do volume celular com inclusões nucleares observadas nos tecidos infectados (MURRAY, 1997; MAYA & AZULAY, 2000). Células com características semelhantes têm sido descritas desde 1881 e em 1921, Goodpasture e Talbot reportaram um caso fatal associado ao HCMV envolvendo pulmão, fígado e rim de uma criança recém-nascida (DREW, 1988). Inclusões pequenas, mas similares às aquelas encontradas na “Doença de Inclusão Citomegálica” foram observadas por Tyzzer em biópsia de lesão de pele causada por herpevírus e Lipschutz foi quem primeiro reconheceu esta similaridade e postulou uma etiologia viral para a “Doença de Inclusão Citomegálica.” (ALFORD & BRITT, 1990).

Cole e Kutner, em 1926, puderam demonstrar que o HCMV estava presente em glândulas submaxilares de cobaia e que sua presença estava associada com células que continham corpúsculos de inclusão. O primeiro estudo sistemático sobre prevalência desta infecção em crianças foi realizado por Farber e Wolbach em 1932, encontrando células citomegálicas típicas nas glândulas salivares de 14% das crianças analisadas (PLACHTER, SINZGER & JAHN, 1996). Fetterman, em 1952, diagnosticou “Doença de Inclusão Citomegálica” por exame citológico de urina e Minder (1953), utilizando a microscopia eletrônica, identificou a partícula viral de 105 nm de diâmetro (DREW, 1988; MAYA & AZULAY, 2000). Margaret Smith conseguiu, em 1954, isolar o vírus em cultura de tecido, usando a infecção de glândula salivar de cobaia como modelo (SMITH, 1956).

Através das técnicas de cultura celular, o HCMV foi independentemente isolado por três laboratórios distintos, em amostras de urina e tecido de crianças com manifestações clínicas de provável infecção pelo vírus (PLACHTER, SINZGER & JAHN, 1996; DREW, 1988). Smith conseguiu isolar o vírus das glândulas salivares de 2 crianças – uma morreu de infecção citomegálica generalizada; no mesmo ano, Rowe *et al.* isolaram três linhagens de HCMV de tecido adenoidal de crianças submetidas a adenoidectomia e a

partir destes estudos, conseguiram adaptar uma linhagem de HCMV em laboratório (AD 169), replicando em culturas de fibroblastos humanos. Weller *et al.* reconheceram o vírus em amostras de urina e pulmão de crianças com doença de inclusão citomegálica generalizada. Em cada laboratório foi detectado um efeito citopático idêntico (ALFORD & BRITT, 1990).

A partir de 1960, com a evolução nos processos cirúrgicos para transplante, a infecção pelo HCMV começa a ser reconhecida como uma doença de importância clínica, sendo considerado o principal agente patogênico em hospedeiros com o sistema imunológico comprometido. Na década seguinte, foram organizados grupos de estudo para avaliar o impacto da infecção nos pacientes imunocomprometidos e propor medidas para manter a infecção sob controle. Foi iniciada, em 1980, a utilização de medidas para o controle do vírus com agentes antivirais e intervenções imunológicas, e atualmente, os avanços para a compreensão dessa virose estão relacionados aos aspectos moleculares da infecção e controle clínico, principalmente nos grupos de risco (RUBIN, 1990; COSTA, 1999).

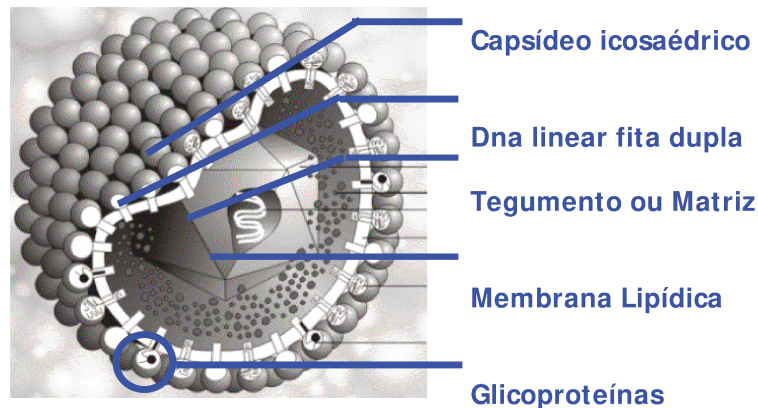
1.2- Características Biológicas do HCMV

1.2.1- Classificação

O HCMV foi originalmente classificado como um beta herpesvírus, baseado em critérios morfológicos e bioquímicos. A morfologia dos vírus do grupo herpes era conhecida desde 1960, quando foi observado o formato icosaédrico através de microscopia eletrônica. Devido à semelhança morfológica e a presença de DNA de fita dupla, o citomegalovírus foi considerado um membro do grupo herpes. Em 1973, o Grupo de Estudos dos Herpesvírus do Comitê Internacional para Nomenclatura dos Vírus decidiu não utilizar o termo “citomegalovírus” e recomendou que fosse dado um número arábico a todos os herpesvírus: o HCMV ficou classificado como Herpesvírus Humano 5 (HHV-5). Em 1979 este mesmo Comitê reabilitou o nome citomegalovírus e dividiu a família *Herpesviridae* em 3 subfamílias representando os vírus herpes simples (*Alphaherpesvirinae*), citomegalovírus, herpesvírus humano, tipo 6 e tipo 7 (*Bethaherpesvirinae*) e o grupo dos vírus linfoproliferativos (*Gammaherpesvirinae*). (HO, 1991; BROWN & ABERNATHY, 1998).

1.2.2- Estrutura Viral

A partícula viral consiste de um capsídeo icosaédrico de 110 nm de diâmetro composto por 162 capsômeros, no interior do qual se encontra o núcleo de 64 nm de diâmetro contendo o material genético (DNA). O vírion completo é cercado por um envelope glicolipídico e tem um diâmetro final de 200nm (MUSTAFA, 1994) (**Figura 01**).



Copyright 1994 – 97 Marko Reschke

Figura 01 - Estrutura do Citomegalovírus Humano (HCMV).

<http://www.biografix.de/hcmv/html/metaframe.htm>

O tamanho do genoma do HCMV é de aproximadamente 230 Kilobases (229.354 pares de bases – GeneBank NC 001347) ou massa molecular relativa de 150-155 x 10⁶ e uma densidade de 1.716 – 1.717 g/cm³ correspondente a 58% de guanossina e citosina.

Este grande genoma codifica mais de 200 proteínas e é composto de duas regiões únicas definidas como longa (UL) e curta (US), flanqueada por sequências repetidas invertidas localizadas internamente (IRL e IRS) e nas extremidades (TRL e TRS) (CHEE *et al.*, 1990; STINSKI, 1990). (**Figura 02**).

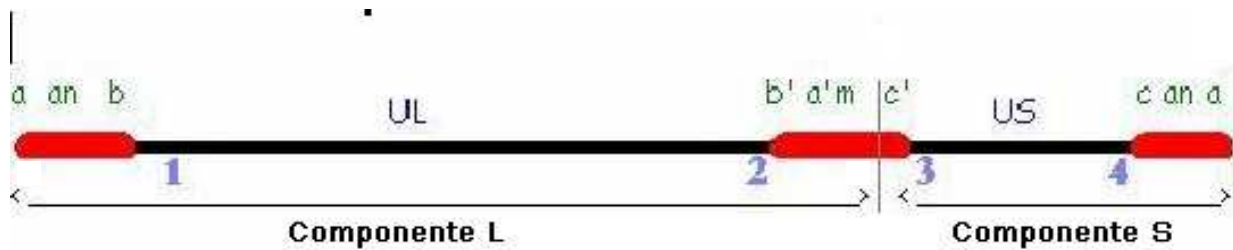


Figura 02 – Organização do genoma do Citomegalovírus Humano.

<http://www.science.mcmaster.ca/Biology/Virology>

1.2.3- Fisiopatologia

O HCMV é um vírus lítico que causa um efeito citopático *in vitro* e *in vivo*. Quando o hospedeiro é infectado, o DNA do HCMV pode ser encontrado em todas as diferentes linhagens celulares e órgãos do corpo. Na infecção inicial, o HCMV infecta as células epiteliais das glândulas salivares, resultando em uma infecção persistente e um local de latência viral. O HCMV também infecta o sistema geniturinário, especificamente os túbulos proximais do rim próximo das áreas corticais. Apesar da replicação viral no rim, é muito raro ocorrer disfunção renal. Uma exceção pode acontecer em indivíduos que receberam transplante de rim, no qual o HCMV é associado com glomerulopatia e possível causa de rejeição do enxerto (GOODRICH, 2001).

1.3- Mecanismo de Replicação e Regulação do HCMV

No hospedeiro natural, algumas células são mais susceptíveis à infecção que outras. (STINSKI, 1990). Os mecanismos moleculares que determinam a permissividade das células para a replicação do HCMV não são entendidos, mas sabe-se que o vírus pode penetrar uma variedade de células humanas e não-humanas sem que ocorra a replicação. Conclui-se, desse modo, que fatores celulares determinam as consequências da infecção pelo HCMV após a entrada viral (MOCARSKI *et al.*, 1990; PLACHTER, SINZGER & JAHN, 1996).

O ciclo de replicação do HCMV é lento em cultura celular e rápido no hospedeiro (EMERY *et al.*, 1999), persistindo latente por muitos anos, podendo se reativar quando diminuem as defesas do organismo infectado, caracterizando-se como um agente oportunista. O HCMV é citopático, podendo produzir destruição tecidual em vários tecidos, como por exemplo, trato gastrointestinal, pulmões, cérebro, etc (ALFORD & BRITT, 1990).

Para iniciar a infecção, é necessário que o vírus seja adsorvido aos receptores de superfície celular, resultado de uma cascata de interações entre proteínas virais e celulares, seguido da fusão do envelope viral com a lamela externa da membrana citoplasmática. Esse processo é rápido e eficiente tanto nos tipos celulares permissivos quanto nos não-permissivos.(SILVA, 2000; LANDOLFO *et al.*, 2003)

A replicação do HCMV apresenta padrão similar aos demais herpesvírus, onde após infecção e incorporação do material genético, um pequeno número de genes é transcrito, codificando proteínas que regulam sua expressão; estas proteínas são denominadas de antígenos imediatamente precoces (IEA) e estimulam a produção de proteínas denominadas de antígenos precoces (EA). Os antígenos são expressos nas membranas celulares e a seguir nas nucleares. Antígenos tardios (LA) tem função constitucional e são expressos após replicação do DNA (STRAUS, 1990; COLIMON & MICHELSON, 1990).

O HCMV e outros tipos de citomegalovírus que infectam outras espécies de animais são altamente espécie-específicas, mas suas características de replicação e síndromes da doença que acarretam são similares (ALFORD & BRITT, 1990; HO, 1991; PANUTTI, 1984). Muitas cepas de HCMV circulam continuamente na população em geral (VAN DER MERR *et al.*, 1996).

Bresnahan e Shenk relataram que as partículas de HCMV não contêm só DNA, mas também quatro tipos de RNA mensageiros (RNAm) (BRESNAHAN & SHENK, 2000).

Esses quatros tipos de RNAm são transcritos de um gene imediatamente precoce (immediately-early), dois genes precoces (early) e um gene tardio (late). Ao penetrar na célula do hospedeiro, o capsídeo viral é transportado ao poro nuclear onde sua carga de DNA é lançada ao núcleo (**Figura 03**). Os quatros RNAm estão localizados no tegumento viral, que é uma capa de proteína entre o capsídeo e o envelope (ROIZMAN, 2000; BRESNAHAN & SHENK, 2000).

Após fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática, o capsídeo (com algumas proteínas associadas ao tegumento) é transportado para o poro nuclear onde o DNA viral é lançado no núcleo formando um círculo e é transcrito pelo maquinário de transcrição celular. Outras proteínas do tegumento permanecem no citoplasma ou são transportadas independentemente ao núcleo. O RNAm viral é transportado para a célula hospedeira com o capsídeo e é traduzido no citoplasma. Pelo menos uma das proteínas codificadas pelo RNAm viral está associada com a cadeia retículo endoplasmático – Complexo de Golgi (BRESNAHAN & SHENK, 2000).

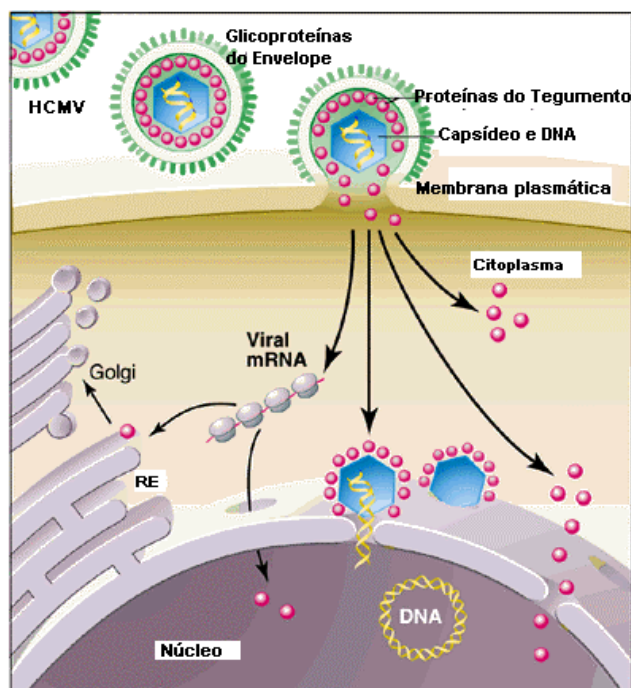


Figura 03 - Mecanismo de infecção do HCMV nas células do hospedeiro. Após fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática, o capsídeo (com algumas proteínas associadas ao tegumento) é transportado para o poro nuclear onde o DNA viral é lançado no núcleo. O DNA forma um círculo e é transcrito pelo maquinário de transcrição celular. Outras proteínas do tegumento permanecem no citoplasma ou são transportadas independentemente ao núcleo. O RNAm viral é transportado para a célula hospedeira com o capsídeo e é traduzido no citoplasma. Pelo menos uma das proteínas codificadas pelo RNAm viral está associada com a cadeia retículo endoplasmático - Complexo de Golgi (BRESNAHAN & SHENK, 2000) .

Ambos, HCMV murino e humano têm três famílias de genes: alfa, beta e gama. Elas são expressas nas fases imediatamente precoces (IE), precoces (E) e tardia (L) do ciclo de replicação das células infectadas. Cada uma das famílias de genes IE e E têm um função regulatória no ciclo celular (SWEET, 1999).

- α (IE) - nesta fase os genes são transcritos através de enzimas nucleares; os RNAm são transportados para o citoplasma e são traduzidos; ocorre a produção de certas proteínas regulatórias que são transportadas para o núcleo e que permitem ao vírus ter controle da síntese macromolecular da célula hospedeira. Os genes transcritos nessa fase podem ter influência na expressão de outros genes virais, seus próprios genes e , possivelmente, genes celulares;
- β (E) - inicia-se após o período IE e é caracterizada pela replicação do DNA viral, produção de proteínas nas células infectadas e produção da progênie;
- δ (L) – fase em que componentes estruturais ou de manutenção dos vírus produzidos e os vírus infectantes são eliminados da célula (MUSTAFA, 1994).

1.4- Características Físico-Químicas

O HCMV é destruído rapidamente pelo calor (37⁰ C por uma hora ou 56⁰ C por 30 minutos), baixo pH (abaixo de 5,0), éter (20% por duas horas), luz ultravioleta por 5 minutos e ciclos de congelamento e descongelamento (HUANG *et al.*, 1980).

A infectividade do HCMV é mais bem preservada por estocagem em diluentes de bicarbonato de sódio na presença de 35% de sorbitol a -90⁰ C. As células infectadas com o vírus suspensas em meio Eagle com 10% a 20% de soro fetal e 10% de DMSO (dimethylsulfoxide) podem ser estocadas por tempo indefinido em nitrogênio líquido a -190⁰ C (WELLER, 1971; COSTA, 1999).

1.5- Epidemiologia e Transmissão

A infecção pelo HCMV é comum na maioria da população, infectando 0,5 a 1,0% de todos os recém-nascidos e mais ou menos 50% da população adulta em países desenvolvidos. A prevalência em países europeus, Austrália e América do Norte varia de 40 a 60%, enquanto que em populações de nível sócio-econômico mais baixo, a prevalência

é significativamente maior, variando entre 80 a 100%. A prevalência de anticorpos contra o HCMV (anti-HCMV) eleva-se com a idade, atingindo níveis máximos após os 25 anos (PANNUTI, 1984; HARDY *et al.*, 1985; NICHOLS & BOECKH, 2000).

No Brasil, os dados epidemiológicos disponíveis são restritos a algumas áreas urbanas, tais como o estado de São Paulo. Estudos usando soros coletados de pessoas saudáveis de diferentes grupos de idade em São Paulo e testados para anticorpos anti-HCMV mostraram que em crianças de 0-4 anos de idade a soroprevalência era de 60%, com um lento aumento após os 15 anos de idade e 80% de positividade no grupo de idade entre 51 a 60 anos (ALMEIDA *et al.*, 2001); a experiência de nosso laboratório, demonstra uma soroprevalência de 93%. (BONON *et al.*, 2004)

Aproximadamente 10% das infecções primárias em pacientes imunocompetentes estão associadas com a síndrome da mononucleose, caracterizada por mal-estar, febre e linfocitose atípica. A grande maioria das infecções primárias passa despercebida. O vírus então permanece latente no endotélio e em células mononucleares do sangue periférico, durante todo o tempo de vida do hospedeiro, controlada pela imunovigilância imunológica mediada por linfócitos T (NICHOLS & BOECKH, 2000).

O HCMV é transmitido por: a) via parenteral, através de sangue ou seus derivados; b) contato inter-humano; c) via materno-fetal, através do canal de parto, contágio pós-parto ou transmissão intra-uterina e, d) transplantes de órgãos (VERONESI *et al.*, 1991).

Os humanos são os únicos reservatórios de HCMV e a transmissão ocorre através do contato pessoa-a-pessoa. Recém-nascidos e crianças podem ser infectados durante o nascimento pela passagem através do cérvix uterino contaminado, durante o período pós-natal através do leite materno ou durante a infância através de contato direto com outras crianças em berçários ou creches e pode estar associado com seqüelas graves. Representa a causa mais comum de retardo mental e distúrbios da audição em crianças. Após a puberdade, transmissão salivar e sexual representam o modo mais importante de infecção por HCMV (de JONG *et al.*, 1998).

Com relação à epidemiologia em grupos de alto risco, sabe-se que pacientes imunossuprimidos, como os transplantados, os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e aqueles que são submetidos à quimioterapia têm maior risco de desenvolver a doença por HCMV (COSTA, 1999).

O HCMV é o mais importante patógeno entre os receptores de transplantes, sendo que a infecção é evidenciada em 2/3 dos casos, embora a doença clínica seja encontrada com menor frequência (RUBIN, 1993; CAMARGO *et al.*, 1996).

Existem três padrões epidemiológicos da infecção por HCMV: *infecção primária, reativação de infecção latente e reinfecção* (RUBIN, 1990).

❖ Na **infecção primária**, a fonte viral pode ser pré-natal (transmissão transplacentária) (EPPS *et al.*, 1995), transfusão intrauterina (VILMER & PÉROL, 1984), perinatal (secreção cervical) e pós-natal (urina infectada, saliva, leite materno) (EPPS *et al.*, 1995), transfusão de sangue e transplante de órgãos (TEGTMEIER, 1989; FORMAN & ZAIA, 1994). Geralmente, a infecção é mais fácil de ser adquirida em condições precárias de higiene. Entre as pessoas com condições sócio-econômicas baixas, a grande maioria das crianças tem sido infectada antes do início da puberdade (DRAGO *et al.*, 2000). Após a infecção primária, o HCMV permanece em uma condição de infecção latente, mas ocasionalmente torna-se reativado e os vírions infecciosos aparecem na saliva e/ou urina. Essas *reativações* temporárias são assintomáticas, mas permitem ao vírus que ele se espalhe horizontalmente e ainda verticalmente se a reativação ocorrer durante a gestação (DRAGO *et al.*, 2000).

❖ A **reativação** é induzida pela alteração no relacionamento parasita-hospedeiro devido a mecanismos fisiológicos, tal como ocorre na gravidez por um decréscimo natural das defesas imunológicas; nas doenças debilitantes ou pelo emprego de drogas imunossupressoras e procedimentos cirúrgicos (DRAGO *et al.*, 2000).

❖ A **reinfeção** é devida a um vírus novo com um diferente tipo antigênico (TEGMEIER, 1989). Embora seja epidemiologicamente importante distinguir *reinfeção* e *reativação*, ambas são clinicamente similares. O termo infecção *recorrente*, portanto, é freqüentemente usado para descrever ambas possibilidades. Em adultos normais, a infecção por HCMV pode ser também considerada uma doença sexualmente transmissível sendo mais prevalente em mulheres com infecção gonocócica anterior ou atual (LESHER, 1988).

1.6- Patogênese

Em geral, a patogênese do HCMV é similar à dos outros herpesvírus. Eles compartilham a capacidade de: 1) disseminar de célula-a-célula mesmo na presença de anticorpos circulantes; 2) estabelecer um estado latente no hospedeiro; 3) reativar em condições de imunossupressão, e 4) induzir no mínimo imunossupressão transitória no receptor (DREW, 1988; SWEET & SMITH, 1990).

A patogênese da doença por HCMV envolve (1) o papel da infecção progressiva do vírus, (2) o efeito da infecção pelo HCMV na função celular, (3) a interação do HCMV com linhagens de células hematopoiéticas; (4) a fuga da vigilância imune mediada pelo HCMV e (5) o papel da aloreatividade e GVHD na infecção pelo HCMV (ZAIA, 1999).

1.7- Manifestações Clínicas

A doença em imunocompetentes quando se manifesta assume forma semelhante à mononucleose infecciosa, classicamente caracterizada por febre de duração prolongada, fraqueza, sudorese, mialgia, hepatomegalia, esplenomegalia ou ambos, e adenopatia. Linfonodomegalia e exsudato amigdaliano são pouco encontrados, ao contrário do que se verifica na mononucleose infecciosa causada pelo vírus Epstein-Barr. Icterícia e exantema

maculopapular podem ser eventualmente observados. Em relação aos exames laboratoriais, o hemograma pode apresentar linfocitose relativa e absoluta e presença de grande número de linfócitos atípicos. Os marcadores hepáticos (ALT e AST) podem estar moderadamente elevados em cerca de 80% dos casos (WELLER, 1971a; WELLER, 1971b; PANUTTI *et al.*, 1987; PANUTTI *et al.*, 2001).

Porém, o vírus pode ser um importante patógeno no feto humano, em pacientes com defeitos de imunidade celular (AIDS, leucemia, linfoma), em receptores de TMO (Transplante de Medula Óssea), TCTH (Transplante Células Tronco Hematopoéticas) e de órgãos sólidos e aqueles submetidos a quimioterapia antineoplásica. Uma vez ocorrida a infecção, o HCMV pode permanecer latente, em equilíbrio com o organismo infectado, reativando a atividade viral quando houver diminuição da imunidade do hospedeiro, caracterizando o HCMV como agente oportunista. Um dos fatores que mais têm contribuído para o aumento da ocorrência da infecção por HCMV é o emprego cada vez mais comum de drogas imunossupressoras (PANUTTI *et al.*, 1984; HO, 1990; MYERS & AMSTERDAM, 1997). Com o aumento da prevalência de AIDS, a infecção por HCMV transformou-se em um grave problema de saúde pública nos vários países do mundo. Devido à profunda e complexa deficiência imunológica causada pelo HIV, o HCMV freqüentemente causa doença disseminada nesse grupo de doentes.

Em pacientes transplantados, com câncer e outros imunossuprimidos, a freqüência e a gravidade da infecção e de suas manifestações clínicas são bastante variáveis. Elas dependem do tipo de transplante, das condições clínicas do doador, da presença ou não de reações devido à incompatibilidade dos antígenos de histocompatibilidade, da natureza e duração da quimioterapia e do regime de imunossupressão utilizada. Nestes pacientes a doença se apresenta com sinais de síndrome de mononucleose sendo que o achado principal é febre de duração variável. Em ordem de freqüência podem ser observados: hepatomegalia, esplenomegalia, mialgia e/ou artralgia, elevações dos marcadores hepáticos e linfocitose. Linfócitos atípicos são menos evidentes nesses pacientes e, particularmente, devido à imunossupressão, leucopenia ocorre mais freqüentemente que leucocitose, juntamente com anemia e trombocitopenia. Após a síndrome da mononucleose, a pneumonia por HCMV é a mais freqüente manifestação em

pacientes imunossuprimidos, principalmente em transplantados de medula óssea. A infecção concomitante por fungos, bactérias gram-negativas e/ou *Pneumocystis carinii* é comum. Hepatite com hepatomegalia, anormalidades de testes de função hepática e icterícia são observados em 7 a 16% de transplantes renais. Coriorretinite secundária ao HCMV é outra entidade clínica cuja freqüência tem aumentado em pacientes imunossuprimidos, especialmente nos portadores de AIDS. O trato gastrointestinal vem cada vez mais sendo atingido pelo HCMV, principalmente nos pacientes com AIDS. O cólon é o local mais freqüentemente acometido, seguido pelo esôfago, reto e intestino delgado. As manifestações clínicas no trato gastrointestinal dependem do nível e grau de acometimento do órgão, bem como da ocorrência ou não de infecções concomitantes ou tumores (GRUNDY, 1990).

A pneumonia por citomegalovírus tem sido uma das mais importantes infecções oportunistas nos hospedeiros imunocomprometidos. A doença é particularmente grave em receptores de transplantes alogênicos de medula óssea (LJUNGMAN, 1995). Nos anos oitenta, foi considerado o maior problema infeccioso nestes pacientes porque foi observada uma mortalidade maior do que 80% mesmo após a introdução do ganciclovir, o primeiro antiviral com boa atividade contra o citomegalovírus *in vitro* e *in vivo* (SHEEP *et al.*, 1985).

Atualmente, o tratamento da pneumonia intersticial pelo HCMV compreende o uso de ganciclovir e imunoglobulina endovenosa. Mesmo com este tratamento, uma vez instalada a pneumonia, pouco mais de metade dos casos poderão ser curados (LJUNGMAN & EINSELE, 1994). Em contraste ao ganciclovir que é fornecido pelo Ministério da Saúde no Brasil e está disponível a todos os pacientes com doença por HCMV, o governo não oferece subsídios para a aquisição de imunoglobulina endovenosa (IgIV-HCMV) e seu alto custo tem sido limitado e o uso é restrito a um pequeno número de pacientes (MACHADO *et al.*, 2000).

1.8- Infecção por HCMV em Pacientes Transplantados Pediátricos

Infecção por HCMV é um dos maiores problemas após o transplante de órgãos sólidos, especialmente em crianças, em que a infecção primária é mais comum do que em adulto. (KULLBERG *et al*, 2003).

Como as crianças têm uma menor tendência para desenvolver GVHD (doença do enxerto contra o hospedeiro) comparadas com os adultos, e por causa da imunodeficiência depois do transplante de células progenitoras em crianças ser menos pronunciada e de menor duração, uma menor frequência de doença por HCMV é esperada comparada com pacientes adultos (HAASTRUP *et al.*, 2005).

Mir *et al.* diagnosticaram infecção ativa em 20,8% dos pacientes pediátricos transplantados renais IgG positivos e doadores também soropositivos. O tempo médio do diagnóstico da infecção ativa por HCMV ocorreu após 2 meses ao transplante. Os pacientes que apresentaram infecção ativa por HCMV fizeram tratamento com ganciclovir bem sucedido. Nenhum desses pacientes foi a óbito ou perdeu o enxerto como resultado da infecção (MIR *et al.*, 2005).

Nos transplantados de medula óssea com soroprevalência similar (21% soronegativos e 22% soropositivos) a infecção ativa por HCMV ocorreu em 21,8% (apenas 8% eram soronegativos) dos pacientes. Para diminuir o risco de infecção por HCMV, 30% dos pacientes receberam o enxerto de doadores soronegativos para HCMV. A doença por HCMV ocorreu em 12,5% dos pacientes com infecção ativa. A pneumonite ocorreu em todos os pacientes que desenvolveram doença por HCMV e problemas gastrointestinais ocorreu apenas em 4% desses pacientes. O tempo médio do aparecimento da infecção foi de 58 dias após o transplante. O tratamento com ganciclovir foi em geral bem tolerado e eficaz. (HAASTRUP, 2005).

1.9- Diagnóstico Laboratorial de Infecção Ativa por HCMV

1.9.1- Métodos Convencionais

Os métodos convencionais para a detecção da infecção ativa pelo HCMV incluem exame direto de amostras por microscopia eletrônica, identificação de células com corpúsculos de inclusão característicos, cultura viral e sorologia (PREISER *et al.*, 2001; PANUTTI, 2001).

1.9.1.1- Microscopia Eletrônica

A vantagem deste método é sua rapidez, pois pode dar um resultado positivo em 15 a 30 minutos, além de se poderem examinar materiais eventualmente contaminados por fungos ou bactérias, que não são apropriados para isolamento viral. Contudo, além de necessitar de equipamento sofisticado e pessoal altamente treinado, tem uma sensibilidade relativamente baixa, só detectando HCMV em amostras que tenham altas concentrações virais. Não é um exame usado na rotina (PANUTTI, 2001).

1.9.1.2- Exames Histopatológicos e Citológicos

A infecção pelo HCMV acarreta, *in vivo*, a formação de células grandes, com inclusões intranucleares (eventualmente intra-citoplasmáticas) que são características e podem ser facilmente visualizadas quando coradas com hematoxilina-eosina, Papanicolau, ou Giemsa. As células de inclusão citomegálicas podem ser demonstradas em fragmentos de tecidos (fígado, rim, pulmão, etc.), em sedimento urinário, lavado gástrico e broncoalveolar e outros materiais. Quando presentes têm grande valor diagnóstico. As grandes vantagens desta técnica são sua simplicidade, rapidez e baixo custo, podendo ser executada em qualquer laboratório. Contudo, a alta incidência de falsos resultados negativos limita muito seu uso e por isso deve ser complementada com técnicas mais sensíveis (HODINKA & FRIEDMAN, 1991; SUASSUNA & MACHADO, 1992; PANUTTI, 2001).

1.9.1.3- Isolamento Viral por Cultura Clássica

O HCMV pode ser isolado de materiais biológicos variados: urina, saliva, secreções cervicais, sêmen, leite, sangue, lavado e aspirado de órgãos e homogenados de tecidos sólidos. Por ser um vírus lábil, o material colhido deve ser processado imediatamente. Caso haja necessidade de conservação ou transporte, é aceitável uma temperatura em torno de 4°C procurando-se evitar o congelamento. Independentemente do material clínico, o isolamento do HCMV em cultura é demorado (COSTA, 1999).

O diagnóstico clássico utilizado para demonstrar infecção ativa por HCMV é a inoculação do material suspeito em cultura de fibroblastos humanos, única linhagem celular que permite sua replicação “*in vitro*”. Porém, além da complexidade envolvida com os métodos de cultura celular, a lenta replicação do vírus faz com que seja necessário um período mínimo de 25 dias para o resultado final (WELLER, 1971; WELLER *et al.*, 1962; PANNUTI, 1984).

1.9.1.4- Métodos Sorológicos

Os métodos sorológicos detectam anticorpos IgM e IgG contra o HCMV e são importantes na identificação da fase da infecção (CHOU, 1990), porém apresentam algumas limitações importantes, sendo essas: pacientes imunossuprimidos podem apresentar infecção grave e, dependendo do grau de imunossupressão, podem ser encontrados resultados falso-negativos. Além disso, a detecção por métodos sorológicos nunca é precoce e necessita muitas vezes de acompanhamento com exames periódicos para definição diagnóstica. Mais recentemente têm sido utilizados testes imunoenzimáticos (ELISA) com anticorpos monoclonais para a detecção de partículas virais na urina ou soro (MCKEATING *et al.*, 1985).

1.9.2- Métodos Modernos

A introdução de testes laboratoriais rápidos e precoces tem permitido aos clínicos detectar a replicação viral e diagnosticar, portanto, a infecção ativa por HCMV antes do início da doença. Isso proporciona a oportunidade de iniciar o tratamento antiviral

precocemente (SIA & PATEL, 2000). Essa então chamada terapia precoce (“*pre-emptive therapy*”) é definida como tratamento altamente efetivo administrado por um curto período, em indivíduos que estão com um alto risco de desenvolver doença por HCMV (RUBIN, 1991).

O diagnóstico precoce da infecção por HCMV pode ser realizado por: imunocitoquímica de fibroblastos humanos infectados, o DEAFF (*detection of early antigen fluorescent foci*) ou “*shell vial*” (GRIFFITHS *et al.*, 1984); a expressão da fosfoproteína de 65 kDa (*pp65*) da matriz do HCMV em leucócitos do sangue periférico, então chamado antigenemia (VAN DER BIJ *et al.*, 1988a, VAN DER BIJ *et al.*, 1988b), a reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de seqüências de ácidos nucleicos virais (DEMLER, 1988; SHIBATTA, 1988; JIWA *et al.*, 1989; EINSELE *et al.*, 1995) e outros métodos moleculares, tais como a PCR quantitativa (COBAS), Nuclisens pp67 Nasba, Captura híbrida (RECOMENDATIONS OF CDC, 2000).

1.9.2.1- Técnica da “Shell Vial” ou cultura com isolamento rápido

Esta técnica consiste basicamente em um isolamento viral clássico, em que diferentes materiais clínicos são inoculados em placas contendo lamínulas (“*shell-vials*”) com monocamadas de fibroblastos humanos em cultura. Contudo, para se evitar a espera de até quatro semanas para aparecimento do efeito citopático característico do HCMV, adiciona-se a estas lamínulas, a intervalos de 24, 48 e 72 horas, uma mistura de anticorpos monoclonais contra diferentes antígenos do vírus, sendo a revelação feita através de técnicas de imunofluorescência. Este método detecta antígenos virais na superfície das células infectadas *in vitro* e apresenta especificidade similar ao da cultura convencional, porém, mais sensível e rápido (RAWLINSON, 1999). **(Figura 4)**



Figura 4 - Cultura com isolamento rápido, fixado e corado 16 horas após inoculação, mostrando proteínas virais no núcleo de fibroblastos humanos infectados.

1.9.2.2- Detecção do antígeno *pp65* do HCMV em sangue periférico (antigenemia)

O método da antigenemia tem sido considerado um grande avanço no diagnóstico da infecção por HCMV em transplantes de órgãos. A presença de antigenemia em leucócitos do sangue periférico proporciona um marcador precoce de infecção ativa pelo HCMV e é um teste rápido (VAN DER BERG *et al.*, 1991). Esse método depende do uso de anticorpos monoclonais que detectam o antígeno viral *pp65*, uma proteína estrutural expressa nos leucócitos do sangue durante a fase precoce do ciclo de replicação do HCMV.

Este teste é limitado à detecção de antígenos virais nos leucócitos. O resultado não é somente qualitativo, mas é também quantitativo, correlacionando a viremia com a gravidade da doença clínica (LO *et al.*, 1997; NIUBÓ *et al.*, 1996; THE *et al.*, 1992).

O teste de antigenemia consiste de várias fases incluindo o isolamento dos leucócitos do sangue periférico pela sedimentação com dextran, lise direta de leucócitos, preparação de lâminas microscópicas, imunocoloração com o uso de anticorpos monoclonais (C10 e C11) contra o HCMV, avaliação microscópica e contagem quantitativa

(ERICE *et al.*, 1995; HO *et al.*, 1998; THE *et al.*, 1995; THE *et al.*, 1990). As lâminas citocentrifugadas contêm um dado número de células que são preparadas por centrifugação com um sobrenadante rico em leucócitos. A fixação das lâminas é feita ou com acetona ou formaldeído; resultados superiores foram obtidos com a fixação com formaldeído (BOECKH *et al.*, 1994; GERNA *et al.*, 1992; THE *et al.*, 1992).

A imunodeteção do antígeno do HCMV é possível através dos métodos de imunoperoxidase indireta ou imunofluorescência indireta (THE *et al.*, 1995).

Em 1988, Win Van der Bij, acreditava que diagnósticos rápidos de infecção ativa por HCMV eram de grande importância para evitar o excesso de tratamento com drogas imunossupressoras (em receptores de transplantes) e guiar a terapia antiviral. A demonstração do HCMV em amostras de sangue é particularmente importante porque a viremia por HCMV é considerada um marcador de infecção ativa e tem demonstrado boa correlação com doença grave. A detecção do antígeno de HCMV em leucócitos do sangue periférico (antigenemia) tem sido demonstrada como uma técnica rápida (5 horas) e sensível na detecção de HCMV (VAN DER BIJ *et al.*, 1988a; THE *et al.*, 1990).

O teste de antigenemia é um método sensível para a estimativa da carga viral sistêmica do HCMV. O método é uma boa escolha para laboratórios com baixo a médio volume de testes, sendo considerado o mais adequado para guiar o início da terapia precoce e para a monitorização da eficácia do tratamento com ganciclovir (GONDO *et al.*, 1994). A desvantagem é que a amostra deve ser processada em curto espaço de tempo, sendo recomendável até 8 horas após a coleta para não haver a diminuição da sensibilidade e em pacientes com grave neutropenia o exame não pode ser realizado devido à baixa contagem de granulócitos. Alternativamente, a PCR para HCMV no plasma ou soro poderá ser realizada nessa situação (SOLANO *et al.*, 2001; BOECKH & BOIVIN, 1998; BOECKH *et al.*, 1992).

1.9.2.3- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Com a introdução da amplificação de DNA por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (SAIKI *et al.*, 1985), a detecção do HCMV foi levada a efeito em amostras contendo pequeno número de cópias do vírus (SHIBATA *et al.*, 1988;

DEMMLER *et al.*, 1988; OLIVE *et al.*, 1989). A amplificação gênica por PCR permite a produção de grandes quantidades de fragmentos específicos de DNA a partir de substratos complexos e em concentrações diminutas. Basicamente, este procedimento permite a amplificação de um fragmento de DNA escolhido, cuja concentração final excede em milhares de vezes a do DNA presente na amostra analisada (COSTA *et al.*, 1992).

Este procedimento consiste em repetidos ciclos de síntese de DNA por meio de dois iniciadores (“primers”) com orientações opostas, isto é, dois segmentos de aproximadamente 20 nucleotídeos, com seqüências complementares às duas extremidades do fragmento alvo, e levadas a efeito por reação enzimática mediada por uma polimerase, com atividade em altas temperaturas (“*Taq* polimerase”). Cada ciclo de reação é constituído por três fases: separação das hélices de DNA a ser amplificado; ligação complementar entre os “primers” e o DNA; e síntese do DNA pela *Taq* polimerase. 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 10^6 cópias, partindo-se de uma única molécula (SAIKI *et al.*, 1985; SHIBATA *et al.*, 1988) (**Figura 5**).

A PCR é um método rápido (4-6 horas), específico e extremamente sensível, porém, devido a sua alta sensibilidade, os principais problemas são os falso-positivos resultantes da contaminação na execução do teste. Resultados falso-negativos podem ser causados pela variabilidade genética das cepas do HCMV ou pela presença de inibidores (THE *et al.*, 1992). Uma importante vantagem da PCR em relação à antigenemia (*pp65*) é que as amostras podem ser estocadas em temperatura ambiente por mais de 72 horas sem uma diminuição significativa nos níveis de DNA (ROBERTS *et al.*, 1997).

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 (BRYTTING *et al.*, 1991).

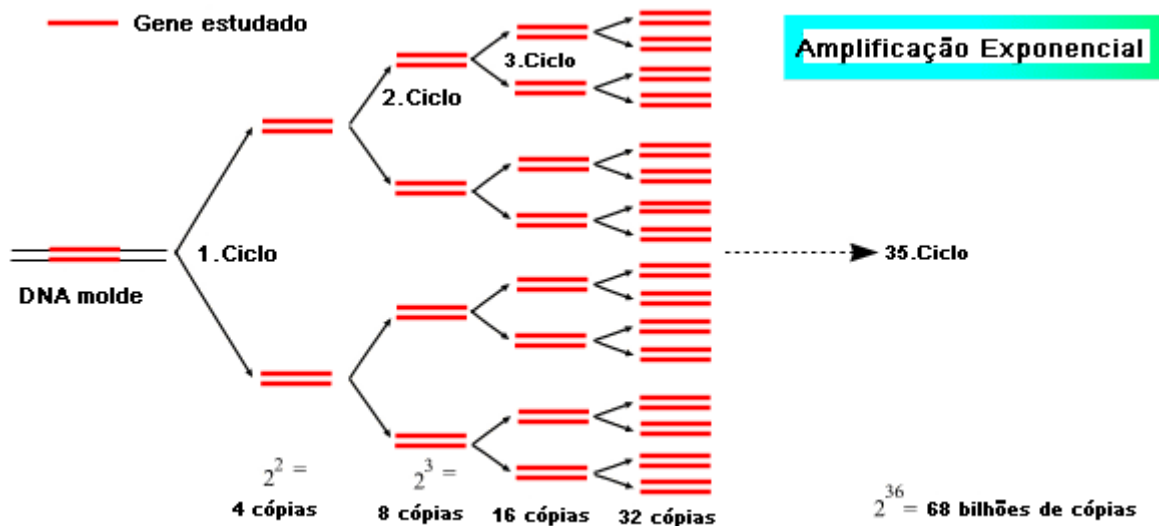


Figura 5 – Esquema representando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

1.10- Linhagens de HCMV

As regiões do HCMV são polimórficas. Cêpas epidemiologicamente não-relacionadas são únicas ao nível de DNA (SHEEP *et al.*, 1996). Diferenças em genes funcionais (IE), glicoproteínas do envelope – gB e gH, polimerase, entre outros) podem existir entre diversas linhagens de HCMV, influenciando sua capacidade em infectar linfócitos e células progenitoras hematopoiéticas, podendo ainda influenciar na virulência das linhagens virais (VOGELBERG *et al.*, 1996; HEBART *et al.*, 1997; WINGART *et al.*, 1998). Estas características também foram observadas em ratos (FRIES *et al.*, 1994; MEYER-KÖNIG *et al.*, 1998).

As cêpas podem ser agrupadas de acordo com as similaridades no DNA e sequência de aminoácidos de certas regiões polimórficas do gene (RASMUSSEN *et al.*, 1997; SHEEP *et al.*, 1998); as variações entre elas têm sido usadas como marcadores genéticos em diversos estudos clínicos e consideram sua associação com a patogênese viral (HEBART *et al.*, 1997; TOROK-STORB *et al.*, 1997; RETIÈRE *et al.*, 1998; AQUINO *et al.*, 2000).

Com a introdução da PCR seguida da análise de restrição enzimática (PCR-RFLP) do produto amplificado, foi possível caracterizar a variabilidade genética do vírus, tornando-se uma importante ferramenta para estudos epidemiológicos (CHOU, 1990; CHOU & DENNISON, 1992; SOUZA *et al.*, 1995; LASRY *et al.*, 1996).

1.10.1- Glicoproteína B (UL55)

A glicoproteína B é talvez o componente do envelope viral mais altamente conservado. É uma proteína essencial para a replicação do vírus *in vitro* e *in vivo*, importante no processo de adsorção na célula hospedeira e disseminação do vírus célula a célula; ela é também um importante alvo da resposta imune humana que induz à formação de anticorpos de neutralização (BRITT & MACH, 1996; LASRY *et al.*, 1996; BONGARTS *et al.*, 1996; ALBEROLA *et al.*, 1998).

Certas regiões do gene gB são altamente variáveis entre as diferentes cepas de HCMV, estando uma delas situada próxima ao sítio de clivagem da protease (entre os aminoácidos 460 e 461) e está envolvida no processo de fusão com a célula hospedeira (VOGELBERG *et al.*, 1996).

Através de análises RFLP no gene que codifica a glicoproteína B, foi possível a distinção de pelo menos 4 genótipos gB (HEBART *et al.*, 1997; TOROK-STORB *et al.*, 1997). A genotipagem do HCMV foi também desenvolvida para ser aplicada em estudos epidemiológicos, determinando a frequência de reinfecção ou reativação viral e ajudando no entendimento da transmissão viral (AUGUSTYNOWICZ & DZIERZANOWSKA, 1998).

Mais recentemente, a técnica de SSCP (“Single Strand Conformation Polymorphism”) tem sido utilizada para a caracterização viral, pois é capaz de discriminar, em fragmentos de DNA do mesmo tamanho, variação em sua sequência. A técnica é baseada na migração das fitas de DNA que, quando denaturadas, o padrão de migração em gel de acrilamida é alterado, em caso de variação genética (PALACIO & DURAN-VILA, 1999). Além de fornecer padrões eletroforéticos conformacionais característicos para os

subtipos de HCMV descritos, a SSCP pode permitir a detecção de alterações na sequência alvo que não são reconhecidas pela endonuclease de restrição e que podem originar novas variantes virais (BINDER *et al.*, 1999; ALBUQUERQUE & COSTA, 2003).

Estudos revelam a prevalência de determinados genotipos entre os diferentes grupos de pacientes imunocomprometidos. TOROK-STORB *et al.* (1997), descreveu em seu estudo com transplantados de medula óssea, a correlação dos tipos gB3 e gB4 com morte por mielossupressão, e também a associação destes tipos com um risco reduzido de GVHD agudo de graus II e IV (TOROK-STORB *et al.*, 1997). Nesse grupo de pacientes, o subtipo gB1 foi encontrado mais comumente em pessoas que sobreviveram à infecção pelo HCMV, com melhor prognóstico (FRIES *et al.*, 1994).

Analizando um grupo de transplantados renais, VOGELBERG *et al.* (1996), não encontrou diferença significativa na prevalência dos tipos gB1, gB2 e gB3 e os tipos gB4 e misturas de linhagens foram raramente encontrados. Também não observou diferença na patogenicidade dos genotipos entre os receptores de rim.

Foi relatado por WADA *et al.* (1997), diferença na distribuição das linhagens do HCMV entre raças. Eles descrevem a prevalência da gB2 na população asiática de transplantados de medula óssea, enquanto em populações caucasianas o subtipo prevalente foi o gB1.

Um estudo brasileiro revelou a alta prevalência, em transplantados renais, de infecção por mais de um genotipo de HCMV durante o seguimento dos pacientes. Além disso, não comprovaram associação de genotipos gB com o desenvolvimento de infecção sintomática por esse vírus (AQUINO & FIGUEIREDO, 2000).

Nenhum estudo brasileiro de genotipagem do HCMV com pacientes transplantados pediátricos exclusivamente foi encontrado na literatura até a conclusão deste estudo. Utilizamos como parâmetros estudos em populações transplantadas em que estavam inclusos adultos e crianças.

1.11- Agentes antivirais com atividade contra o HCMV

Atualmente, sete terapias antivirais são aprovadas pelo FDA (US Food and Drug Administration) na profilaxia ou terapia contra a infecção por HCMV: Imunoglobulina endovenosa do HCMV, Aciclovir, Valaciclovir, Ganciclovir, Valganciclovir, Foscarnet e Cidofovir. Os agentes antivirais podem ser administrados terapeuticamente para doença por HCMV ou profilaticamente (ex. terapia precoce), quando o risco de doença por HCMV é alto (ex. pacientes transplantados). Entre eles, ressaltamos:

1.11.1- Imunoglobulina endovenosa

Nucleosídeos são os verdadeiros agentes antivirais que agem contra o HCMV, embora as imunoglobulinas possam produzir algum efeito antiviral, particularmente em combinação com estes agentes. O uso de imunoglobulina endovenosa é considerado assunto controverso e em ambos receptores soronegativos ou soropositivos, o principal benefício é provavelmente não-específico devido às diferenças entre as doses e tipos de imunoglobulinas, estado imunológico do doador e receptor, profilaxia da *GVHD* aguda, regime de condicionamento e uso de transfusão de granulócitos (GUGLIELMO *et al.*, 1994).

Imunoglobulina endovenosa é preparada com uma mistura de plasma sanguíneo de adultos selecionados e que possuem altos títulos de anticorpos anti-HCMV (SAWYER, 2000).

O uso de HCMV-IGIV ou IgIV em combinação com ganciclovir é considerado o tratamento de escolha para pneumonia por HCMV diagnosticada em pacientes receptores de TMO e CPP (NICHOLS & BOECKH, 2000).

1.11.2- Ganciclovir

Ganciclovir é o primeiro agente antiviral que é específico para o tratamento do HCMV e ganciclovir endovenoso é geralmente considerado terapia de primeira linha para doença por HCMV sintomática.

Ganciclovir sódico é um nucleosídeo acíclico sintético análogo do 2'-deoxiguanosina que inibe a replicação dos herpesvírus *in vivo* e *in vitro*. Difere estruturalmente do aciclovir por uma única cadeia caboxil lateral. Esta alteração estrutural confere à droga aproximadamente 50 vezes mais atividade que o aciclovir contra o HCMV (MAR et al, 1985).

O nome químico do ganciclovir é 9-[2-hidroxi-1-(hidroximetil)-etoximetil]guanina, embora seja mais comumente conhecido como dihidroxipropoximetil guanina (DHPG) (**Figura 6**). Ganciclovir tem uma fórmula molecular de $C_9H_{13}N_5O_4$ e um peso molecular de 255,23 g/l. Quando formulado como um sal monossódico, ganciclovir tem uma fórmula molecular de $C_9H_{12}N_5NaO_4$ e um peso molecular de 277,22 g/l (MAR *et al.*, 1985).

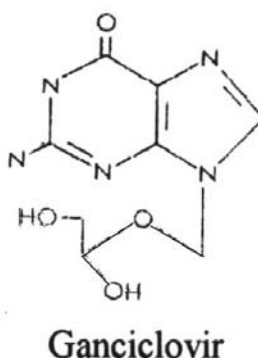


Figura 6 - Estrutura Química do Ganciclovir

Os mecanismos de ação do ganciclovir foram estudados *in vitro* em células humanas infectadas com o HCMV. Embora o completo mecanismo de ação não esteja compreendido, foi estabelecido que a capacidade do ganciclovir em inibir a replicação viral é decorrente de sua inibição seletiva na síntese do DNA viral pela forma trifosforilada da droga. As DNA polimerases das células do hospedeiro são consideravelmente menos sensíveis do que a polimerase viral em relação aos efeitos do ganciclovir trifosfato (MAR *et al.*, 1985; VERHEYDEN, 1988). Acredita-se que a atividade antiviral do ganciclovir-trifosfato seja o resultado da inibição da síntese do DNA viral que ocorre de duas maneiras:

- 1) Inibição competitiva da DNA polimerase viral;
- 2) Incorporação do ganciclovir-trifosfato dentro do DNA viral, resultando assim na terminação do filamento de DNA viral.

Com a detecção precoce da infecção por HCMV, a terapia precoce com ganciclovir reduz significativamente o desenvolvimento da doença por HCMV (WINSTON *et al.*, 1993).

O ganciclovir pode causar granulocitopenia, trombocitopenia, azoospermia e elevação da creatinina sérica. Pacientes com retinite por HCMV, tratados com ganciclovir endovenoso por 3 meses apresentam granulocitopenia em 40% dos casos e em 15% trombocitopenia, que em geral, desaparecem após descontinuação da terapia. A granulocitopenia devido ao ganciclovir pode ser prevenida com o uso concomitante de fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) (CRUMPACKER, 1996).

1.11.3- Foscarnet

Foscarnet (trisodium phosphonoformate) é um análogo pirofosfato que inibe reversivelmente e não-competitivamente a atividade da polimerase do DNA do HCMV (BALFOUR, 1990; CHRISP & CLISSOLD, 1991). Foscarnet não requer ativação intracelular para exercer sua atividade antiviral e não é incorporado à cadeia de DNA viral. Foscarnet bloqueia reversivelmente o sítio de ligação da DNA polimerase viral e inibe a clivagem de pirofosfato para deoxidonucleosídeo trifosfato (BALFOUR, 1990; CHRISP & CLISSOLD, 1991; ERICE, 1999). Foscarnet é o tratamento de primeira linha para retinite por HCMV quando a terapia com ganciclovir é ineficaz ou não tolerada.

Em um estudo randomizado, a terapia precoce com Foscarnet foi associada com distúrbios eletrolíticos frequentes. Eletrólitos no soro foram monitorados durante o tratamento com Foscarnet, e baixos níveis de eletrólitos encontrados foram corrigidos por suplementação. A eficácia do Foscarnet e do ganciclovir no tratamento precoce da infecção ativa por HCMV é similar, mas o ganciclovir está associado com neutropenia grave (REUSSER, *et al.*, 2002; SALZBERGER *et al.*, 1997).

1.11.4- Cidofovir (HPMPC)

Cidofovir ([S]-1-[3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl] cytosine) difosfato é um inibidor competitivo da polimerase do DNA do HCMV. Similarmente ao ganciclovir, a incorporação do cidofovir difosfato dentro do DNA viral causa uma demora e subsequente cessação do alongamento da cadeia do DNA do HCMV (DE CLERCQ, 1993; ERICE, 1999). Cidofovir tem sido associado com toxicidade renal moderada, similar ao descrito para Foscarnet em análise retrospectiva de experiências clínicas realizadas em centros da Europa (LJUNGMAN *et al.*, 2001).



2- OBJETIVOS

Sabendo-se da importância do diagnóstico precoce da infecção ativa e da identificação das linhagens de HCMV em pacientes transplantados, sua possível relação com a infectividade e apresentação clínica, este trabalho, avaliando dois diferentes tipos de transplantes pediátricos atendidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP e Centro Infantil Boldrini, teve como objetivos principais:

- I. Diagnosticar e monitorizar, pelas técnicas de antigenemia e PCR, a infecção ativa por HCMV em pacientes pediátricos transplantados de rim ou medula óssea em seguimento no Hospital das Clínicas da UNICAMP e no Centro Infantil Boldrini, Campinas.
- II. Determinar a prevalência dos subtipos gB do HCMV nos pacientes estudados com infecção ativa pelo HCMV, através da análise de restrição enzimática
- III. Avaliar retrospectivamente, a relação de uma determinada linhagem com o quadro clínico apresentado, pelos dois grupos de pacientes estudados, durante a infecção ativa e provável doença pelo HCMV.



3- CASUÍSTICA

3.1- Diagnóstico de infecção ativa por HCMV

Foram estudados prospectivamente, 42 pacientes pediátricos, submetidos a transplantes de células tronco hematopoéticas (TCTH) ou transplante renal (Tx renal), acompanhados no Centro Infantil Boldrini e no Hospital das Clínicas da UNICAMP, respectivamente. Destes, 19 são receptores de rim e os outros 23 receptores de medula óssea. A **tabela 1** mostra os pacientes estudados por grupo, idade, sexo, doença de base e tipo de transplante. De maneira geral, a idade dos pacientes seguidos variaram de 2 a 18 anos (mediana 11 anos), 26 deles pertenciam ao sexo masculino e 16 ao sexo feminino.

Entre os transplantados de células tronco hematopoéticas, 9/23 (39%) receberam transplante tipo autólogo e 14/23 (61%) tipo alogênico.

Para todos os pacientes incluídos neste estudo foi feito o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo I) assinado pelos responsáveis, sendo este aprovado pelo “Comitê de Ética em Pesquisa”, bem como o projeto para esta pesquisa (anexo II).

A monitorização iniciou-se a partir do dia zero do transplante até 150 dias após o mesmo, semanalmente, no período compreendido entre agosto de 2004 a dezembro de 2005.

Foram coletadas amostras de sangue em tubos contendo como anticoagulante EDTA de todos os pacientes submetidos ao transplante durante o período acima citado, para a realização da antigenamia e Nested-PCR.

Durante o estudo foi feita uma ficha de acompanhamento dos pacientes (anexo III e VI) com dados clínicos pré e pós transplante obtidos dos prontuários médicos.

3.2- Genotipagem

Foram incluídos no estudo de determinação das linhagens de HCMV, 20 pacientes pediátricos, 5 receptores de TCTH e 15 receptores de rim que apresentaram infecção ativa pelo HCMV durante o nosso estudo. Foi realizada a genotipagem de 1 amostra positiva de cada paciente com infecção ativa por HCMV, sendo que para os pacientes que apresentaram recorrência da infecção durante o período do estudo foram

realizadas genotipagem de 2 amostras deste paciente, 1 amostra de cada período de infecção ativa, isso para que fosse possível distinguir essa recorrência em reativação viral ou reinfeção.

Tabela 1- Características gerais (sexo, idade, doença de base e tipo de transplante) dos transplantados pediátricos participantes do estudo.

Paciente Nº	Sexo	Idade (anos)	Doença de base	Tipo de transplante
Tx renal				
01	F	16	SN	DC
02	M	16	IRC	DC
03	F	13	IRC	DC
04	M	15	HR	DC
05	M	11	IRC	DC
06	F	17	DIR	DC
07	M	11	IRC	DC
08	M	14	IRC	DC
09	F	11	IRC	DR
10	M	11	IRC	DC
11	M	10	IRC	DC
12	F	15	IRC	DR
13	M	18	IRC	DC
14	F	8	IRC	DC
15	M	5	IRC	DR
16	M	11	IRC	DC
Paciente Nº	Sexo	Idade (anos)	Doença de base	Tipo de transplante
17	F	10	IRC	DC
18	F	15	IRC	DR
19	F	9	IRC	DC
TCTH				
20	M	14	LMA	Autólogo
21	M	14	LMA	Alogênico
22	F	15	LH	Autólogo
23	M	16	LMA	Alogênico
24	M	18	LMA	Autólogo
25	F	12	LMA	Autólogo
26	M	13	LH	Autólogo
27	M	3	LH	Autólogo
28	M	8	LMC	Alogênico
29	F	8	SG	Alogênico
30	M	18	LH	Autólogo
31	M	18	LH	Alogênico
32	M	5	AAG	Alogênico
33	M	2	LMA	Alogênico
34	M	2	LMA	Alogênico
35	M	2	LMA	Alogênico
36	M	18	LH	Autólogo
37	F	15	LH	Autólogo
38	F	12	AAG	Alogênico
39	M	18	LMA	Alogênico
40	M	10	AAG	Alogênico
41	F	11	LMA	Alogênico
42	F	4	LMA	Alogênico

TCTH: transplante de células tronco hematopoéticas; TxR:transplante renal; M:masculino F: feminino; SN: Síndrome Nefrótica; IRC: Insuficiência Renal Crônica; DIR:Displasia renal; HR:Hipoplasia Renal DC: Doador Cadáver; DR: Doador Relacionado; LMA:Leucemia Mielóide Aguda; LH: Linfoma Hodgkin; LMC: Leucemia Mielóide Crônica; SC: Sarcoma Granulocítico AAG:Aplasia de Medula Grave.



4- MÉTODOS

No controle dos pacientes de risco para doença pelo HCMV, é importante a utilização de técnicas rápidas e sensíveis de diagnóstico precoce de infecção ativa por HCMV. Neste estudo, foram realizadas as seguintes técnicas:

- ❖ Antigenemia para detecção e quantificação do antígeno pp65 do HCMV, no sangue periférico;
- ❖ Reação em cadeia da polimerase tipo “Nested”, para detecção de DNA do HCMV, no sangue periférico;
- ❖ Identificação das linhagens de HCMV das amostras HCMV positivas por “Nested PCR” com posterior análise por enzimas de restrição.

4.1- Antigenemia - Detecção do antígeno pp65 do HCMV em neutrófilos do sangue periférico.

A detecção do antígeno pp65 foi realizada de acordo com o método descrito por Van der Bij *et al.*, 1988; Van der Bij *et al.*, 1989; Jiwa *et al.*, 1989 e Boeckh, 1992, com algumas modificações:

4.1.1- Extração de leucócitos polimorfonucleares do sangue Periférico

As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo como anticoagulante EDTA, encaminhadas e processadas no prazo de até 6 horas após a coleta. Foram coletados de 5 a 10 ml de sangue. Este material foi transferido para tubos de plástico de 15 ml (tipo Falcon). Os leucócitos foram separados pela sedimentação com dextran a 5% diluído em PBS, pH 7.4 (sangue/dextran na proporção 4:1); homogeneizado gentilmente por inversão e colocado em estante inclinada para tubos em ângulo de 45 graus por 30 minutos em estufa à temperatura de 37°C. Usando Pipeta tipo Pasteur, o sobrenadante rico em leucócitos polimorfonucleares foi transferido para outro tubo de plástico de 15 ml e centrifugado 10 minutos a 1200 rpm. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e o

sedimento celular foi agitado no vórtex vigorosamente. Para remoção das células vermelhas persistentes, o sedimento celular foi suspenso em 10 ml da solução de cloreto de amônio gelado, pH 7.4, homogeneizado e mantido em temperatura de 4°C por 10 minutos, seguido de centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado novamente e o sedimento celular foi lavado com PBS e centrifugado 10 minutos a 1200 rpm, mais 2 ou 3 vezes. O sedimento celular foi então ressuspensionado em 200 µl a 1000 µl de PBS; dependendo da quantidade de leucócitos (após transplante, a contagem de células brancas pode ser muito baixa, sendo necessário a ressuspensão em 200 µl).

4.1.2- Preparação das lâminas

Os leucócitos foram contados em câmara de Neubauer e para cada amostra preparou-se uma suspensão com $1,5$ a 2×10^6 células/ml. 100 µl desta suspensão foram colocados no interior do citofunil e em seguida centrifugados em citocentrífuga (Marca Revan – modelo Citociclo) por 5 minutos à 970 rpm ; as lâminas foram feitas em duplicata. A seguir, as lâminas foram secas, fixadas com CMV POTM kit (Reagente C - IQ Products) por 10 minutos, lavadas 3 vezes com PBS e permeabilizadas com CMV POTM kit (Reagente D - IQ Products) por 5 minutos. Após nova lavagem, as lâminas foram novamente secas, embrulhadas em papel manteiga e papel alumínio e estocadas à temperatura de - 80° C, até o momento da revelação.

Após a preparação das lâminas, o precipitado de leucócitos remanescente foi utilizado para o teste da Nested PCR.

4.1.3- Coloração das lâminas

As lâminas foram desembulhadas, secas e a área da reação delimitada com esmalte. O anticorpo monoclonal utilizado foi o CLONAB HCMV do laboratório BIOTEST AG (Dreieck-W. - Germany), contendo uma combinação de anticorpos monoclonais C-10 e C-11, que reconhecem o antígeno pp65 do HCMV. Após a secagem do

esmalte, as lâminas foram rinsadas com PBS e escorridas. A seguir, foram aplicados 35 µl de monoclonal diluído 1:10 em PBS por área de reação e incubado em câmara úmida à temperatura ambiente por 45 minutos. A área de reação a partir deste ponto não pode secar. A seguir, as lâminas foram lavadas 3 vezes, 5 minutos cada, com PBS. O conjugado utilizado foi o anti-mouse (Horse Radish Peroxidase labeled goat anti-mouse IgG) do laboratório BIOTEST AG. Foi aplicado 35 µl do conjugado “anti-mouse peroxidase” diluído 1:80 em PBS na área da reação. Então, as lâminas foram incubadas à temperatura ambiente em câmara úmida por 30 minutos e após, lavadas por 3 vezes com PBS, 5 minutos para cada lavagem. Após as lavagens, as lâminas foram cobertas com a solução de AEC (amino-etil-carbazol - Sigma), recém-preparada (20 mg de AEC dissolvida em 5 ml de dimetilformamida - Sigma e em 100 ml de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4.9) e adicionado 50 µl de H₂O₂ a 30%. As lâminas foram deixadas na solução de AEC, no escuro, por 8 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, foram lavadas por 10 minutos com tampão acetato de sódio 0.1 M, pH 4.9. Finalmente, lavadas 3 vezes com PBS, 1 minuto, 2 minutos, 5 minutos e coradas com hematoxilina de Mayer, marca MERCK, (na diluição 1:10), por 20 a 30 segundos, rinsadas com água destilada até eliminar todo o corante e montadas com glicerina tamponada.

4.1.4- Leitura e interpretação das lâminas

Para a leitura das lâminas (**Figura7**) foi utilizado um microscópio óptico, marca Nikon, aumento de 40 vezes e foram observadas:

❖ **Células HCMV antígeno *pp65* positivas:** identificadas pela coloração marrom característica, nuclear ou perinuclear, principalmente em leucócitos polimorfonucleares; ocasionalmente em monócitos.

❖ **Células HCMV antígeno *pp65* negativas:** núcleo azul

Controles positivos foram utilizados em todas as reações e consistia de lâminas congeladas de um ou mais pacientes com antigenemia sabidamente positiva ou controles comerciais (fibroblastos fetais humanos infectados com HCMV).



Figura 7-Reação de imunoperoxidase (antigenemia). Células antígenos-positivas *pp65* do HCMV, identificadas pela coloração castanho-avermelhada nuclear ou perinuclear em leucócitos polimorfonucleares; Células negativas – núcleo azul. Os leucócitos foram preparados em lâminas microscópicas, fixadas com paraformaldeído/NP40 e submetidos à coloração com imunoperoxidase com a utilização dos anticorpos monoclonais C10/C11.

4.2- Reação em Cadeia da Polimerase Tipo Nested PCR

4.2.1-Extração de DNA

A extração do DNA genômico de leucócitos foi realizada a partir do precipitado de leucócitos extraídos com Dextran 5%, anteriormente descrito.

4.2.1.1- Lise de Leucócitos

Ao precipitado de leucócitos foi adicionada uma solução de NaOH 50mM e incubado por 20 minutos a 100°C. Posteriormente foi adicionada uma solução de Tris HCl (pH 7,5) e centrifugado por 5 minutos para formação do precipitado de restos celulares. O sobrenadante foi transferido para outro eppendorf estéril.

4.2.2- Amplificação Gênica do HCMV pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

4.2.2.1- Condições da reação

A Reação em Cadeia da Polimerase seguiu o método descrito por Saiki *et al.* (SAIKI *et al.*, 1985; SHIBATA *et al.*, 1988; DEMMLER *et al.*, 1988), com algumas modificações. A orientação dos “primers” faz com que a síntese do DNA ocorra na região interna entre eles. Desse modo, 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 no ciclo precedente. Assim, o número de cópias do fragmento alvo tem um aumento exponencial, o que faculta no final de 30 ciclos um aumento da ordem de 10^6 cópias, partindo-se de uma única célula (SAIKI *et al.*, 1985).

Cada reação de amplificação utilizou 0,5 a 0,7 µl do DNA (obtido pelo método de extração de DNA anteriormente descrito) em volume total de 20 µl, contendo 50 mM de cloreto de potássio, 10 mM de Tris (pH 8.4), 2,5 mM de cloreto de magnésio, 0,1 mM de cada “primer” MIE 4 e MIE 5 (Tabela 4 – ver sequência de nucleotídeos), 200 mM da mistura desoxirribunucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 1 unidades de *Taq* DNA polimerase.

Foram complementados 30 ciclos de amplificação para cada amostra e cada ciclo foi constituído de 3 etapas: a) separação das hélices de DNA por aquecimento a 94° C durante 1 minuto; b) ligação complementar entre os “primers” e o DNA em temperatura de 55° C por 1 minuto (anelamento) e c) síntese do DNA pela *Taq* polimerase, em temperatura de 72° C por 1 minuto (extensão).

Os ciclos foram realizados automaticamente em equipamento apropriado (“DNA Thermal Cycler” - Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn, EUA).

4.2.2.1.1. Iniciadores (“primers”) externos

Foram usados dois iniciadores que flanqueiam uma região conservada nas diversas cepas de vírus HCMV, não amplificando DNA de outros herpes-vírus (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Sequência dos primers externos que flanqueiam uma região conservada do genoma do HCMV, utilizados na PCR.

Primers externos *	Sequência	Sentido
MIE 4	CCA AGC GGC CTC TGA TAA CCA AGC C	“sense”
MIE 5	CAG CAC CAT CCT CCT CTT CCT CTG G	“antisense”

*MIE = Principal antígeno imediatamente precoce - Human cytomegalovirus (Towne) major immediate-early antigen (MIE) gene, exon 4. (GeneBank HS5MIE4).

§ Expresso como número de nucleotídeos. Os nucleotídeos são numerados sequencialmente dentro de cada gene.

O par de primers denominados primers MIE, amplificam uma sequência de 435 pares de base do DNA do HCMV que codifica uma porção do antígeno “major immediate-early” (MIE) do HCMV (cepa Towne). A porção do gene MIE que é amplificado está contido no exon 4 deste gene (DEMMLER, 1988).

4.2.3- Reamplificação do genoma do HCMV pela NESTED PCR

Utilizando-se do mesmo método descrito acima, uma alíquota do DNA amplificado na primeira reação foi reamplificado utilizando um par de “primers” interno (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Sequência de primers internos que flanqueiam uma região conservada do genoma do HCMV utilizados na nested PCR.

Primer interno *	Sequência	Sentido
IE 1	CCA CCC GTG GTG CCA GCT CC	“sense”
IE 2	CCC GCT CCT CCT GAG CAC CC	“antisense”

* IE = antígeno imediatamente precoce - Human cytomegalovirus (Towne) immediate-early antigen (IE) gene, exon 4. (GeneBank HS5MIE4).

§ Expresso como número de nucleotídeos. Os nucleotídeos são numerados sequencialmente dentro de cada gene.

O par de primers denominados primers IE, amplificam uma sequência de 159 pares de base do DNA do HCMV (**Figura 8**) que codifica uma porção do antígeno “immediate-early” (IE) do HCMV (cepa Towne). A porção do gene IE que é amplificado está contido no exon 4 deste gene. (STENBERG *et al*, 1984)

As condições da reação foram as mesmas utilizadas para fazer a primeira reação de amplificação (PCR).

Para controle interno da reação de PCR foi feita uma PCR para amplificação do gene da Beta-Globina, identificando a presença de DNA nas amostras analisadas, para eliminar resultados falso-negativos por esse motivo. Os primers utilizados para flaquear essa região estão descritos a baixo na tabela 4.

Tabela 4 – Sequência de primers que flanqueiam uma região conservada do gene da Beta-Globina utilizados na PCR:

Primer	Sequências (5'> 3')
PCO3	ACACAACGTGTGTTCACTAGC
PCO4	CAACTTCATCCACGTTTCACC

Quarenta ciclos de amplificação foram realizados automaticamente em equipamento apropriado (“DNA Thermal Cycler”-MJ,EUA). Os ciclos foram precedidos por um período de desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos, para inativação de qualquer atividade de proteases que poderia interferir com a reação enzimática e, após o último ciclo, o período de extensão final (72°C) foi de 7 minutos.

- Desnaturação: 94°C – 1 minuto;
 - Anelamento: 55°C – 1 minutos;
 - Extensão: 72°C – 1 minuto.
- } 40 vezes

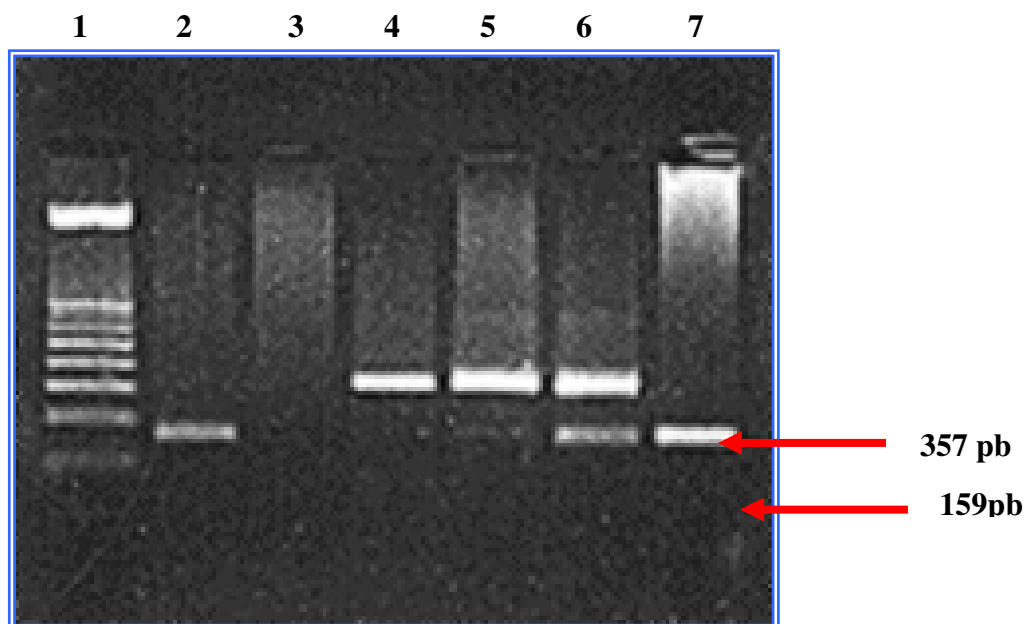


Fig. 8- Análise direta do fragmento amplificado, após eletroforese em gel de agarose 2%.
 Linha 1 – Marcador de peso molecular (ladder de 100 pb – GIBCO BRL); Linha 2 – controle positivo (cepa AD169 do HCMV); linha 3 – controle negativo; linhas 4 e 5 – amostras de DNA de sangue positivas para o gene da Beta-Globina (controle interno da reação) e negativas para o HCMV; linha 6 – amostras de DNA de sangue positiva para o gene da Beta-Globina e para o HCMV; linha 7 – controle positivo (cepa AD 169 do HCMV).

4.2.4- Cuidados especiais utilizados para se evitar contaminação das amostras durante a reação da PCR.

Afim de se eliminar problemas de contaminação das reações, o que poderia ocasionar resultados falso-positivos, foram tomados os seguintes cuidados:

- ❖ As amostras a serem amplificadas foram manipuladas em salas diferentes (sala pré-PCR) de onde a amplificação foi feita (sala pós-PCR);
- ❖ Todos os reagentes e materiais pré-PCR e pós-PCR foram preparados e utilizados em ambientes diferentes;
- ❖ Antes da abertura dos tubos de microcentrífuga foi efetuada rápida centrifugação para concentrar o líquido contido no tubo na região inferior e evitar sua dispersão por evaporação.
- ❖ Todo material plástico (ponteiras e tubos plásticos para PCR) utilizado foi novo e não autoclavado;
- ❖ Trocas constantes de luvas foram feitas durante todo o procedimento.

4.3- Identificação das linhagens de HCMV:

A identificação das diferentes cêpas do HCMV foi feita à partir do DNA de pacientes que apresentaram antigenemia e/ou 2 “Nested PCR” consecutivos positivos para a região IE do vírus.

4.3.1- Condições da reação:

Para primeira reação utilizamos 0,7 µl da amostra HCMV positiva para um volume total de 20,0 µl da reação. Foram adicionados 10% do volume total da reação de Tampão 10X (50 mM de cloreto de potássio, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4)), 2,0 mM de

cloreto de magnésio, 120 nmol dos “primers” gB 1319 e gB 1659 (**Tabela 5**), 200 mM de cada desoxirribunucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 0,02 unidade de *Taq* DNA polimerase.

Tabela 5- Sequência dos “primers” utilizados para a amplificação das glicoproteínas gB do HCMV.

*O “primer” gB 1319 foi utilizado para as duas reações.

Nome	Sequência	Sentido	Tipo (“primer”)
gB 1319	5'TGGAAC T GGAACGTTT GGC3'	“sense”	Externo e Interno
gB 1659	5'GCACCTTGACGCTGGTTTGG3'	“antisense”	Externo
gB 1604	5'GAAACGCGCGGCAATCGG3'	“antiense”	Interno

Os “primers” gB 1319 e gB 1604 foram descritos por CHOU, 1990; gB 1659 por VOGELBERG *et al.*, 1996.

Para a primeira reação, trinta e cinco ciclos foram realizados automaticamente em equipamento apropriado (“DNA Thermal Cycler”-MJ,EUA). Os ciclos foram precedidos por um período de desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos e no final, 7 minutos a 72°C para a extensão final.

O ciclo de amplificação para a primeira reação compreendeu:

- Desnaturação: 94° C – 30 segundos
 - Anelamento: 55° C – 45 segundos
 - Extensão: 72° C – 1 minuto
- } 35 vezes

Na etapa seguinte mantivemos a concentração dos reagentes para um volume total de reação de 40,0 µl (volume necessário para a continuidade do procedimento – análise de restrição). Nesse caso adicionamos 1,4 µl da primeira PCR como molde e o par de “primers” usado foi gB 1319 e gB 1604.

O ciclo da “Nested PCR” para a gB foi o seguinte:

- Desnaturação: 94°C - 30 segundos;
 - Anelamento: 60°C - 30 segundos;
 - Extensão: 72°C - 1 minuto.
- 35 vezes

4.3.2- Detecção

Cerca de 6,0 µl do produto amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado em sistema Polaroyd.

4.3.3- Análise do fragmento amplificado por enzimas de restrição (PCR-RFLP - “restriction fragment length polymorphism”)

Após confirmação da amplificação, os produtos da gB foram digeridos com enzimas de restrição para a determinação das linhagens de HCMV (CHOU *et al.*, 1990). Utilizamos as enzimas Hinf I e Rsa I, para a clivagem da região gB (**Figura 9**).

Cerca de 12,0 µl do produto amplificado foi utilizado para a execução da reação de digestão, que continha também, 2,0 µl do tampão da enzima e 0,5 µl da enzima correspondente. Água deionizada e estéril foi adicionada para completar 20,0 µl e a mistura foi conduzida ao banho-maria a 37° C overnight.

Os fragmentos produzidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1000 (Gibco-BRL) a 2,0% corado com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em sistema Polaroyd.

As diferentes linhagens de HCMV apresentam padrões de digestão característicos (CHOU *et al.*, 1990), que são levados em consideração para a distinção entre os tipos de HCMV.

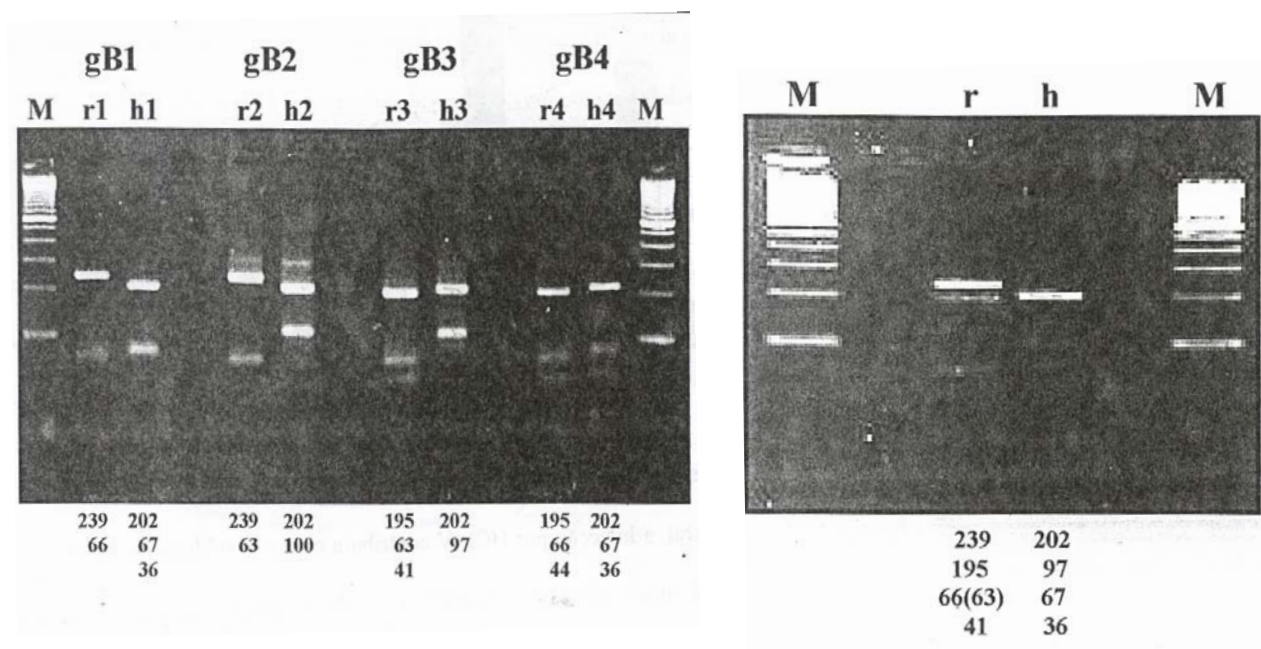


Figura 9- Padrão da digestão para os genótipos (gB1,gB2, gB3, gB4 e mistura de linhagens) do HCMV com as enzimas RsaI e Hinf I. Eletroforese em gel de agarose 1000 (Gibco-BRL) 2,0% corado com brometo de etídio

4.4- Critérios utilizados para definição de Infecção ativa por HCMV.

A presença de pelo menos um dos itens abaixo foi considerada indicativa de infecção ativa por HCMV:

- ❖ **Nested PCR** - duas ou mais reações positivas, consecutivas (EINSELE *et al.*, 1995);
- ❖ **Antigenemia** - uma ou mais células antígeno-positivas para HCMV, detectadas nos leucócitos polimorfonucleares (BOECKH *et al.*, 1999).

4.5- Critérios utilizados para definição de doença por HCMV

Para caracterização de doença por HCMV, além das evidências laboratoriais de infecção ativa citadas acima, fez-se necessária a presença de manifestações clínicas compatíveis com aquelas sabidamente causadas pelo HCMV (LJUNGMAN & PLOTKIN, 1995; LJUNGMAN *et al.*, 2002):

- ❖ **Pneumonia (HCMV-IP)** - a presença de sinais e/ou sintomas de doença pulmonar combinado com a detecção do HCMV em lavado brônquio-alveolar ou biópsia de pulmão. A detecção deverá ser realizada por cultura celular, testes histopatológicos, análise imunohistoquímica ou hibridização *in situ*.
- ❖ **Doença Gastrointestinal (HCMV-TGI)** - sintomas gastrointestinais (colite, gastrite ou esofagite) associados com histologia ou imunohistoquímica positiva para HCMV de biópsias de lesões macroscópicas do trato gastrointestinal;
- ❖ **Hepatite** - O vírus deverá ser demonstrado em biópsias hepáticas (por cultura, imunohistoquímica, hibridização “*in situ*” ou PCR) em combinação com:
 - Aumento de pelo menos 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 HCMV em fluido cerebrospinal por PCR, por cultura ou detecção do antígeno;
- ❖ **Retinite** - lesões oftalmológicas típicas, com ou sem provas virológicas, diagnosticadas pelo exame de fundo de olho, realizado pelo oftalmologista, com presença de retinite necrotizante com infiltrado branco algodoso, áreas de hemorragia e irite e vitrite mínima (PANUTTI *et al.*, 1996).

4.6- Critérios utilizados para definição de recorrência de infecção ativa por HCMV

- ❖ Recorrência da infecção ativa pelo HCMV foi definido como infecção ocorrendo após a negatificação dos testes de AGM e/ou PCR após o tratamento do episódio inicial da infecção.

4.7- Critérios utilizados para definição de infecção ativa e/ou doença tardia por HCMV

- ❖ Infecção ativa e doença por HCMV tardia foram definidas como aquelas que ocorreram mais de 100 dias após o transplante.



5- RESULTADOS

Foram realizados neste estudo, 1.680 exames para detecção de infecção ativa pelo HCMV, incluindo os exames de nested PCR (840) e AGM (840) nos 42 pacientes pediátricos monitorizados

Através dos prontuários médicos foi possível identificar os resultados dos testes sorológicos dos pacientes pediátricos incluídos neste estudo.

A genotipagem do HCMV foi realizada em 20/42 (47,6%) pacientes com infecção ativa detectada durante nosso estudo. Para os pacientes que apresentaram recorrência da infecção foram realizadas a genotipagem em uma amostra positiva da primeira ocorrência de infecção ativa e em uma amostra positiva da recorrência da infecção. A genotipagem das mostras dos pacientes que apresentaram recorrência foi realizada com a finalidade principal de diferenciar essa recorrência em reinfecção ou reativação viral.

5.1- Infecção ativa pelo Citomegalovírus Humano (HCMV)

A infecção ativa pelo HCMV foi detectada por PCR e/ou AGM em 20/42 pacientes estudados (47,6%); 20/42 pacientes (47,6%), tiveram pelo menos 2 resultados de PCR positivos consecutivos; 16/42 pacientes (38%), tiveram pelo menos 1 célula antígeno-*pp65* positiva. O tempo 0 refere-se ao dia do transplante. Entre os 20/42 pacientes com infecção ativa, 14/20 (70%) apresentaram sintomas de provável doença por HCMV. Entre os 14 pacientes que apresentaram provável doença por HCMV, a taxa de óbito por doença pelo HCMV foi de 7,1% (1/14), sendo que este óbito ocorreu no grupo de transplantados de células tronco hematopoéticas. (**Tabela 6**)

Tx renal: 15/19 pacientes deste grupo (79%) apresentaram infecção ativa pelo HCMV, diagnosticada por PCR e/ou AGM, com uma mediana de tempo de 44 dias após o transplante (variação 19-137 dias); 13/19 pacientes (68,4%) tiveram pelo menos 1 célula antígeno-*pp65* positiva, com uma mediana de 45 dias após o transplante (variação 33-124); 15/19 (79%) tiveram 2 resultados de PCR positivos consecutivos, com uma mediana de 40 dias (variação 12-145 dias) após o transplante. Entre os 15/19 pacientes com infecção ativa pelo HCMV deste grupo, 11/15 (73,3%) apresentaram sintomas de provável doença por HCMV; porém, nenhum óbito por HCMV ocorreu.

Apenas 2 pacientes (10,5%) deste grupo receberam profilaxia com ganciclovir (contra o HCMV) por apresentarem sorologia IgG negativa para HCMV e com doador soropositivo para HCMV, porém estes desenvolveram infecção ativa por HCMV.

TCTH: 5/23 pacientes (21,7%) apresentaram infecção ativa pelo HCMV, diagnosticada por PCR e/ou AGM, com uma mediana de tempo de 47 dias (variação 0 - 103 dias); 5/23 pacientes (21,7%) tiveram pelo menos 2 ou mais resultados de PCR positivos consecutivos, com uma mediana de 37 dias (variação 0 - 86 dias); 3/23 pacientes (13%) tiveram pelo menos 1 célula antígeno positiva, com uma mediana de 43 dias (variação 15 - 103 dias) após o transplante.

Entre os 5 pacientes com infecção ativa pelo HCMV pertencentes a este grupo de pacientes, 3/5 (60%) apresentaram sintomas de provável doença por HCMV, 1 óbito ocorreu (20%), tendo como provável causa doença disseminada pelo HCMV. Nenhum dos pacientes deste grupo recebeu tratamento profilático contra HCMV.

Tabela 6- Resultados dos testes de monitorização laboratorial nos grupos estudados.

	TCTH	Tx renal
Infecção ativa por HCMV detectada por PCR e/ou AGM (%)	5/23 (21,7)	15/19 (79)
Infecção ativa por HCMV detectada por PCR (%)	5/23 (21,7)	15/19 (79)
Infecção ativa por HCMV detectada por AGM (%)	3/23 (13)	13/19 (68,4)
Provável Doença por HCMV (%)	3/5 (60)	11/15 (73,3)
Óbito por HCMV (%)	1/5 (20)	0

Legenda: **PCR** – reação em cadeia da polimerase; **AGM** – antigenemia.

5.2- Análise do Status Sorológico

Entre os 42 receptores pediátricos de transplante de medula óssea ou rim , 39 eram soropositivos para o HCMV (93%) e receberam o enxerto de doadores também soropositivos (**D+/R+**) e 3/42 eram soronegativos para o HCMV (7%). Dos transplantados de células tronco hematopoéticas, 22/23 pacientes (95,7%) eram soropositivos para o HCMV e receberam enxerto de doadores soropositivos e do grupo dos transplantados renais, 17/19 pacientes (89,5%) eram soropositivos e receberam enxerto de doadores soropositivos. (**tabela 7**)

Tabela 7 – Incidência de infecção ativa pelo HCMV detectada nos receptores estudados, divididos pelo status sorológico.

	TCTH	Tx Renal	Total
Taxa de Infecção Ativa, n (%)	5/23 (21,7)	15/19 (79)	20/42 (47,6)
<i>Infecção Primária:</i>	1/23 (4,3)	2/19 (10,5)	3/42 (7,0)
D+/R-	1/1 (100)	2/2 (100)	3/3 (100)
D-/R-	-	-	-
<i>Recorrência:</i>	4/23 (17,4)	13/19 (68,4)	17/42 (40,5)
D+/R+	4/4 (100)	13/13 (100)	17/17 (100)
D-/R+	-	-	-

Legenda: D+: doador com sorologia IgG positiva para o HCMV; R+: receptor com sorologia IgG positiva para o HCMV; D-: doador com sorologia IgG negativa para o HCMV; R-: receptor com sorologia IgG negativa para o HCMV.

Tabela 8- Índice de infecção ativa, recorrência após término do tratamento com ganciclovir, provável doença e óbito por HCMV, baseados no status sorológico IgG-HCMV do doador (D) e do receptor (R), nos grupos estudados.

	Status Sorológico HCMV	Pacientes, n (%)	Infecção ativa pelo HCMV (PCR+ e/ou AGM+), n (%)	Recorrência da Infecção ativa	Provável Doença por HCMV	Óbito por HCMV
TCTH	D+/R+	22/23 (95,6)	4/22 (18,2)	¼ (25)	2/4 (50)	1/4 (25)
	D+/R-	1/23 (4,3)	1/1 (100)	0/1 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)
	D-/R+	0	0	0	0	0
	TOTAL	23 (100)	5/23 (21,7)	1/5 (20)	3/5 (60)	1/5 (20)
Tx Renal	D+/R+	17/19 (89,5)	13/17 (76,5)	2/13 (15,3)	9/13 (69,2)	0
	D+/R-	2/19 (10,5)	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (100)	0
	D-/R+	0	0	0	0	0
	TOTAL	19 (100)	15/19 (78,9)	4/15 (26,6)	11/15 (78,6)	0

Legenda: D+: doador com sorologia IgG positiva para o HCMV; R+: receptor com sorologia IgG positiva para o HCMV; D-: doador com sorologia IgG negativa para o HCMV; R-: receptor com sorologia IgG negativa para o HCMV.

A análise da **Tabela 8** permite observar o índice de infecção ativa e provável doença pelo HCMV estratificados pela sorologia do doador (D) e receptor (R). O sorogrupo D+/R+ apresentou infecção ativa em 40,5% (17/42) dos casos, sendo 23,5% (4/17) dos casos no Grupo dos transplantados de células tronco hematopoética e 76,5% dos casos no Grupo dos transplantados de rim.

5.3- Tempos de início de detecção da infecção ativa pelo HCMV

A comparação entre os tempos de início de detecção de infecção ativa pelo HCMV por AGM e PCR não mostrou diferenças significantes entre os diferentes grupos pediátricos transplantados estudados (**Tabela 09 e Gráfico 1**).

Tabela 09 – Mediana dos tempos de início de detecção de infecção ativa pelo HCMV por PCR ou AGM.

	TCTH	Tx renal
Dia início infecção ativa detectada por <i>PCR e/ou AGM</i> – mediana - dias (variação)	47 (0-103)	44 (19-137)
Dia início infecção ativa detectada por <i>PCR</i> – mediana - dias (variação)	37 (0-86)	40 (12-145)
Dia início infecção ativa detectada por <i>AGM</i> – mediana – dias (variação)	43 (15-103)	45 (33-124)

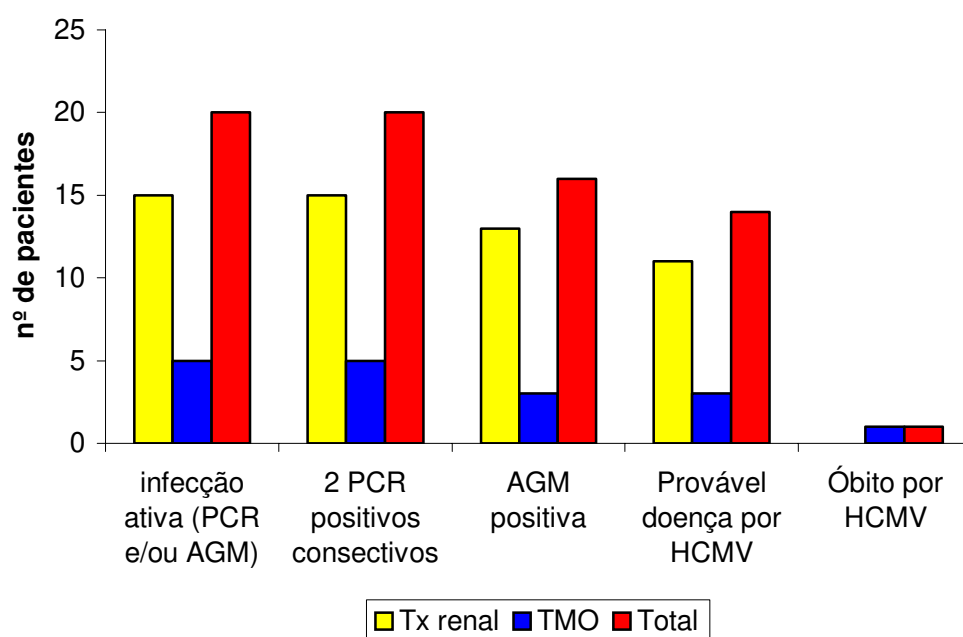


Gráfico 1 - Resultados dos testes de monitorização laboratorial nos grupos estudados.

5.4- Diagnóstico da Infecção Ativa pelo HCMV detectada por antigenemia

Dos 42 pacientes transplantados pediátricos acompanhados neste estudo, 16 (38%) apresentaram 1 ou mais células positivas para a antigenemia. Sendo que desses 16 pacientes, 13 (81%) são receptores de rim e apenas 3 (19%) receptores de células tronco hematopoética. O fato da menor incidência de positividade entre os receptores de medula óssea deve-se possivelmente pela presença de transplantes autólogos (39%), entre os pacientes incluídos neste estudo. Dos 19 transplantados pediátricos renais 2 receberam

tratamento profilático com ganciclovir por apresentarem teste sorológico negativo para IgG, sendo que o mesmo soroconverteu depois de apresentarem infecção ativa por HCMV após o transplante. A mediana do tempo de apresentação de positividade para a antigenemia foi de 45 dias após o transplante (33-124).

Tabela 10 – Incidência de infecção ativa por HCMV diagnosticada por antigenemia

	Positivo	Negativo	Total
Tx RENAL	13 (68,4%)	6 (31,6%)	19
TCTH	3 (13,0%)	20 (87,0%)	23

Observamos que 14/16 dos pacientes (87,5%) apresentaram antigenemia acima de 5 células positivas e estes (100%) apresentaram sintomas de provável doença pelo HCMV e 2/26 pacientes (12,5%) com antigenemia abaixo de 5 células positivas, não apresentaram sintomas de provável doença pelo HCMV durante o período pós-transplante estudado (150 dias) (**Tabela 10**).

Tabela 11 - Avaliação do número de células-positivas em relação à doença por HCMV nos pacientes estudados do **Grupo Total**.

	Total		
	Provável Doença (+)	Provável Doença (-)	Total
AGM $\geq$ 5 células positivas (*)	14	0	14
AGM < 5 células positivas (negativa)	0	2	2
Total	14	2	16

NOTA: Avaliação feita até 150 dias após o transplante

(*) Neutrófilos positivos em 300.000 contados

5.5- Diagnóstico da Infecção Ativa pelo HCMV por NESTED-PCR.

Os testes de Nested PCR foram realizados nas mesmas amostras utilizadas para a antigenemia, obtida desde o dia 0 até o dia 150 após transplante.

Os resultados de PCR para HCMV mostraram-se positivos para 20/42 pacientes (47,6%) estudados, sendo que 5/23 (27,3%) eram receptores de transplante de células tronco hematopoéticas e 15/19 (79%) receptores de rim.

Os 42 pacientes (100%) foram divididos em seis grupos: (a) AGM e PCR ambas negativas; (b) apenas AGM positiva; (c) apenas PCR positiva; (d) AGM positiva precedendo PCR positiva; (e) PCR positiva precedendo AGM positiva (f) AGM e PCR positivas simultaneamente (**Tabela 12**).

Entre os pacientes receptores de células tronco hematopoéticas, nem PCR e AGM foram detectadas em 18/23 pacientes (78,3%) durante a monitorização. Esses pacientes não receberam terapia com ganciclovir. Apenas PCR positiva foi detectada em 2/23 pacientes (8,7%). PCR positiva precedendo AGM positiva ocorreu em 5/23 pacientes (21,7%).

Nos pacientes pediátricos receptores de rim, nem AGM e PCR foram detectadas em 4/19 pacientes (21%) durante a monitorização. Esses pacientes não receberam terapia com ganciclovir. Apenas PCR positiva em 2/19 pacientes (10,5%). PCR positiva precedeu a AGM positiva em 6/19 pacientes (31,6%). AGM e PCR foram positivas ao mesmo tempo em 9/19 pacientes (47,4%).

Tabela 12- Concordância entre AGM e PCR nas amostras coletadas dos 42 pacientes monitorizados.

	AGM/PCR negativas	Apenas AGM+	Apenas PCR+	AGM (+) precede PCR (+)	PCR(+) precede AGM (+)	AGM+ e PCR+ simultaneamente
TCTH (n = 23)	18 (78,3%)	0	2 (8,7%)	0	5 (20%)	0
Tx renal (n = 19)	4 (21%)	0	2 (10,5%)	0	6 (31,6)	9 (47,4%)
Total (n = 42)	22 (52,4%)	0	4 (9,5%)	0	11 (26,2%)	9 (21,4%)

5.6- NESTED-PCR para Amplificação do Gene da Glicoproteína B (gB)

Todos pacientes (20/20) que apresentaram infecção ativa por HCMV apresentaram positividade para a N-PCR para as regiões MIE e IE do HCMV. Estas amostras foram selecionadas e amplificadas para a região da Glicoproteína B para posterior genotipagem (**Figura 10**).

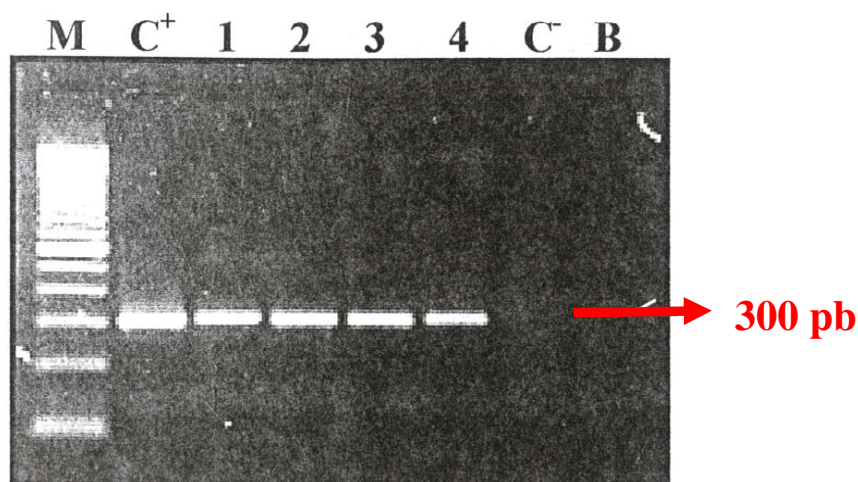


Figura 10 – Amplificação 300 pb do DNA do HCMV com os “primers” gB1319 e gB1604

Legenda referente à figura 9:

M – marcador de peso molecular (Ladder 100 pb; Gibco-BRL, USA)

C+ - controle positivo para a reação (cepa AD 169)

1 a 4 – N-PCR positivo para gB

C⁻ - controle negativo para reação

B – branco de reação (água)

A análise com enzima de restrição permitiu identificar padrões eletroforéticos distintos, caracterizando os genótipos virais. A frequência de distribuição dos subtipos virais está descrita na **tabela 13 e Gráfico 2**.

Tabela 13 – Distribuição dos genótipos na população estudada com infecção ativa pelo HCMV

Genótipos	TMO n (%)	Tx renal n (%)	Total n (%)
gB1	2/5 (40)	7/15 (46,7)	9/20 (45)
gB2	1/5 (20)	4/15 (26,7)	5/20 (25)
gB3	0	0	0
gB4	0	0	0
Mistura de linhagens	2/5 (40)	4/15 (26,6)	6/20 (30)

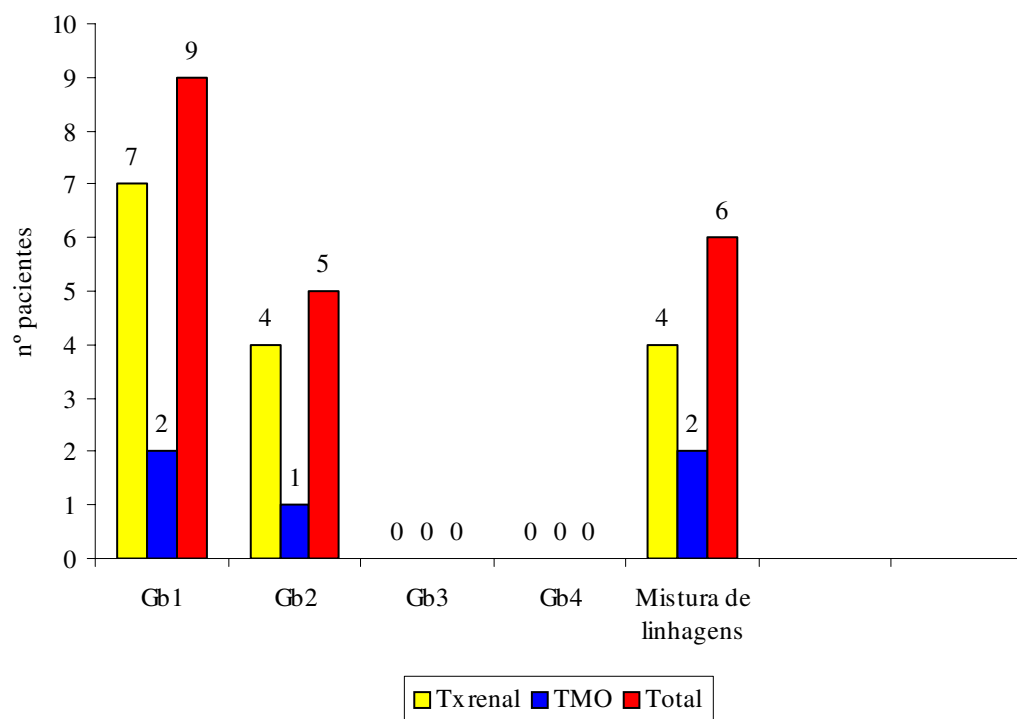


Gráfico 2 – Distribuição dos genótipos do HCMV nos pacientes estudados

Levando em consideração os pacientes que apresentaram mistura de linhagens como cepa infectante durante a infecção ativa por HCMV temos a seguinte distribuição:

Tabela 14 – Distribuição dos genótipos encontrados nas misturas de linhagens

Mistura de linhagens	TMO n (%)	Tx Renal n (%)	Total n (%)
gB1gB2	1/2 (50)	2/4 (50)	3/6 (50)
gB1gB4	1/2 (50)	1/4 (25)	2/6 (33,3)
gB2gB3	0	1/4 (25)	1/6 (16,7)

5.7- Avaliação da relação entre os genótipos e o quadro clínico apresentado pelos pacientes

A avaliação da possível relação entre os genótipos e o quadro clínico apresentado pelos pacientes está representado na **tabela 15**. Os dados de sintomatologia e gravidade do quadro apresentado pelo paciente durante a infecção ativa por HCMV foram coletados através da análise dos prontuários médicos dos pacientes.

Tabela 15 – Relação entre o genótipo e o quadro clínico apresentado pelo paciente durante a infecção ativa

GENOTIPO	QUADRO CLÍNICO
gB1	Diarréia, vômito, febre, melhora após tratamento com ganciclovir.
gB2	Sintomas iguais aos apresentados por gB1, porém mais intensos; reativação viral após tratamento com ganciclovir.
Mistura de linhagens	Sintomas leves à assintomático

Embora sem comprovações estatísticas e apesar do pequeno número de pacientes avaliados, pode-se perceber que nos pacientes receptores pediátricos de rim ou medula óssea estudados, os genótipos gB1 tendem a se relacionar com a presença de sintomas característicos de uma provável doença por HCMV, assim como gB2, porém com maior intensidade nesse último e levando em consideração que se apresentou relacionado também à presença de reativação viral. Por outro lado, os pacientes que apresentaram mistura de linhagens como cepa infectante apresentaram melhor prognóstico.



6- DISCUSSÃO

O citomegalovírus humano (HCMV) é um herpesvírus cosmopolita e que geralmente é capaz de produzir infecções persistentes e assintomáticas durante toda a vida. No entanto, em populações que são imunologicamente comprometidas (transplantados, portadores de HIV, pacientes submetidos à quimioterapia, portadores de doença auto-imune) ou que têm um sistema imune imaturo (recém-nascidos) o HCMV é o mais freqüente patógeno oportunista, podendo gerar inúmeras manifestações clínicas, que variam desde uma doença com pouca repercussão clínica até uma doença grave, que envolve risco de vida (DARLINGTON *et al.*, 1991; LEHNER, STAMMINGER & MACH, 1991; NAVARRO *et al.*, 1997).

Infecção por HCMV é um dos maiores problemas após o transplante de órgãos sólidos, especialmente em crianças, em que a infecção primária é mais comum do que em adulto. (KULLBERG *et al.*, 2003).

Como as crianças têm uma menor tendência para desenvolver GVHD (doença do enxerto contra o hospedeiro) após TCTH comparadas com os adultos, e por causa da imunodeficiência depois do transplante de células progenitoras em crianças ser menos pronunciada e de menor duração, uma menor frequência de doença por HCMV é esperada comparada com pacientes adultos (HAASTRUP *et al.*, 2005).

Mir *et al.* diagnosticaram, em 15 (20,8%) de 72 pacientes pediátricos transplantados renais, infecção por HCMV, sendo que nenhum deles foi à óbito ou perdeu o enxerto como resultado da infecção (MIR *et al.*, 2005).

Nos transplantados pediátricos de células tronco hematopoéticas a infecção por HCMV, segundo Haastrup *et al.*, ocorreu em 21,8% (24 de 110) dos pacientes, dos quais 3 [12,5% (3/24)] desenvolveram doença por HCMV, todos com pneumonites e 1 com doença gastrointestinal. O tempo médio do aparecimento da infecção foi de +58 dias após o transplante. O tratamento com ganciclovir foi em geral bem tolerado. (HAASTRUP, 2005).

Em nossa casuística a infecção por HCMV ocorreu em 20/42 pacientes (47,6%) estudados, sendo 5/20 (25%) receptores pediátricos de células tronco hematopoéticas e 15/20 (75%) receptores pediátricos de rim. Considerando os grupos separadamente temos

entre os transplantados de células tronco hematopoéticas uma frequência de 21,7% (5/23) e entre os transplantados de rim uma frequência de 79% (15/19). Essa diferença entre a frequência de infecção ativa encontrada entre os diferentes pacientes pediátricos estudados, levando em consideração que o estudo foi realizado no Brasil (elevado índice de soroprevalência), deve-se possivelmente à inclusão de transplante autólogo entre os pacientes receptores de células tronco hematopoéticas, o que provavelmente tenha diluído os resultados da frequência de infecção ativa nesse grupo. Outra explicação, para o elevado índice da infecção entre os pacientes pediátricos receptores de rim, é a imunossupressão mais intensa nesses pacientes e o elevado índice de doador cadáver, considerando que esses são fatores de risco importantes para a infecção ativa por HCMV.

Sabe-se que as manifestações clínicas causadas por infecção pelo HCMV podem ser decorrentes da variabilidade genética entre as diferentes linhagens do vírus (LEHNER, STAMMINGER & MACH, 1991). Acredita-se que algumas linhagens têm preferência em infectar determinados órgãos ou tipos celulares, ou que são mais virulentas ou mais imunossupressoras que outras, ou ainda que têm uma maior probabilidade de contribuir para a rejeição de órgão, em casos de transplante (BINDER *et al.*, 1999). Essas variações ocorrem, geralmente, em regiões gênicas altamente conservadas e em consequência, funcionalmente relevantes (VOLGELBERG *et al.*, 1996; WIGART *et al.*, 1998), além disso, elas têm sido utilizadas como marcadores genéticos em estudos clínicos para se fazer a distinção entre as cepas e avaliar sua associação com a patogênese viral (RETIERE *et al.*, 1998).

As glicoproteínas do envelope dos herpesvírus podem ser alvos para anticorpos de neutralização do vírus, controlam a entrada viral e têm papel importante na disseminação do vírus entre as células do hospedeiro (RASMUSSEN *et al.*, 1991). Regiões variáveis, especialmente nas glicoproteínas B (gB) do envelope do HCMV, têm sido extensivamente estudadas, através de técnicas que envolvem biologia molecular, para caracterizar as diferentes linhagens do vírus e sua possível relação com a gravidade de expressão de doença em diversos grupos de pacientes (CHOU, 1990; CHOU & DENNISON, 1991; FRIES *et al.*, 1994; SHEPP *et al.*, 1998; ROSEN *et al.*, 1998; MEYER-KÖNIG *et al.*, 1998 e 1998(2); GILBERT *et al.*, 1999; BINDER *et al.*, 1999).

A metodologia geralmente aplicada para a distinção entre os subtipos de HCMV é a PCR-RFLP (CHOU, 1990; CHOU & DENNISON, 1991; FRIES *et al.*, 1994), que através de um tratamento com endonucleases de restrição, o produto da PCR é clivado em fragmentos de diferentes tamanhos e o perfil da digestão é determinante das linhagens. Para a gB, utilizam-se as enzimas de restrição *Rsa I* e *Hinf I*, que determinarão pelo menos quatro subtipos virais. SHEEP *et al.* (1998) em seus estudos para a mesma região, caracterizaram um quinto genótipo. Recentemente, TRINCADO *et al.* (2000), encontraram em um grupo de crianças com infecção congênita por HCMV, dois novos genótipos virais (gB6 e gB7).

Possivelmente os genótipos gB tenham sítios de latência diferenciados e reativem em diferentes locais em cada grupo de pacientes, sendo assim, o tipo e a gravidade do defeito imune característico de cada um destes grupos, pode determinar a prevalência dos diversos genótipos do HCMV (BONGARTS *et al.*, 1996).

Resultados obtidos anteriormente em estudo retrospectivo feito em nosso laboratório em população transplantada de células tronco hematopoéticas (ALBUQUERQUE & COSTA, 2003), mostrou ser o genótipo o gB1 mais freqüente encontrado neste trabalho. Embora a correlação do subtipo com a clínica apresentada não tenha sido estatisticamente possível, houve uma tendência na correlação do genótipo gB3 com a apresentação clínica mais grave. Da mesma forma, o genótipo gB1, bem como a mistura de cepas pareceram estar relacionadas a um quadro clínico mais brando.

Devido a ausência de trabalhos publicados com o mesma casuística deste estudo, ou seja, especificamente transplantados pediátricos de células tronco hematopoéticas ou rim, quando levamos em consideração estudos realizados com pacientes transplantados adultos, os resultados apresentados corroboram os dados da literatura quanto a prevalência do subtipo 1 na população alvo. TOROK-STORB *et al.* (1997) e RASMUSSEN *et al.*, (1997), descreveram a predominância do gB1 em um grupo de transplantados de células tronco hematopoéticas, e os dados por eles apresentados sugerem que as linhagens gB3 e gB4 possam estar relacionadas com morte por mielossupressão e

menos risco de GVHD aguda de graus II a IV. Outros autores (CHOU & DENNISON, 1991; FRIES *et al.*, 1994) também encontraram na população transplantada de células tronco hematopoéticas estudada por eles, maior frequência de linhagens de genótipo 1 e relacionaram-na com melhor prognóstico da infecção. WADA *et al.* (1997), em seus relatos, associaram a prevalência do gB2 com população transplantada de células tronco hematopoéticas de origem oriental e do gB1 em caucasianos. Talvez as diferenças genótípicas possam estar relacionadas à variação na distribuição geográfica dos subtipos.

Uma das propriedades conferidas a glicoproteína B do HCMV, promover a entrada e disseminação viral nas células hospedeiras, provavelmente explique as diferenças observadas no tropismo e virulência dos genótipos gB (MEYER-KÖNIG *et al.*, 1998). Desta forma, as linhagens podem ser diferentes em sua habilidade de regular e interagir com moléculas de adesão podendo caracterizar a prevalência de genótipos específicos em determinados grupos de pacientes.

Houve predominância do gB1 também nos transplantados renais avaliados no presente estudo, e a gravidade da infecção pôde ser associada com a cepa infectante. Os pacientes que apresentaram como cepa infectante gB1 apresentaram sintomas (febre, vômito, diarreia) característicos de provável doença por HCMV durante a infecção ativa, os que apresentaram gB2 também apresentaram os mesmos sintomas, porém mais graves e com uma característica particular deste grupo, que foi a recorrência da infecção, sendo assim caracterizada como reativação viral por ser causada pelo mesmo cepa (gB2) infectante. Por outro lado, os pacientes que apresentaram mistura de linhagens (gB1gB4, gB1gB2 e gB2gB3) permaneceram assintomáticos.

Os genótipos gB3 e gB4 isoladamente não foram encontrados neste estudo.

Em nossa casuística, 42 pacientes pediátricos (23 receptores de células tronco hematopoéticas e 19 receptores de rim) foram avaliados quanto a infecção ativa por HCMV após o transplante e como resultado desta investigação detectamos infecção ativa por HCMV em 20 destes pacientes (5 receptores de células tronco hematopoéticas e 15 receptores de rim). Nesses pacientes que apresentaram infecção ativa por HCMV fizemos a genotipagem da amostra positiva de sangue. Para os pacientes que apresentaram recorrência

da infecção (5/20) a análise do genótipo viral foi feita nos dois períodos da infecção, caracterizando, em todos os casos, reativação viral. Como resultados da genotipagem tivemos uma prevalência do genótipo 1 entre a população estudada, sendo que o genótipo 2 também teve uma frequência considerável entre estes pacientes. A mistura de linhagens também foi detectada e esteve relacionada com melhor prognóstico da infecção ativa pelo HCMV. Os genótipos 3 e 4 não foram encontrados isoladamente em nenhuma amostra genotipada dos pacientes estudados.



7- CONCLUSÕES

1. Diagnosticou-se a infecção ativa por HCMV em 20/42 pacientes pediátricos estudados, 5/20 receptores de transplante de medula óssea e 15/20 receptores de transplante de rim, detectada através da antigenemia e/ou Nested-PCR;
2. Genotipou-se a cepa infectante dos pacientes que apresentaram infecção ativa por HCMV durante o estudo, através da análise com enzima de restrição; gB1 foi o genótipo mais prevalente na população estudada e gB3 e gB4 isoladamente não foram encontrados nesse estudo;
3. Observou-se a presença de misturas de linhagens em 6/20 pacientes estudados, sendo a mistura gB1gB2 a mais prevalente; gB3 e gB4 foram encontrados em mistura de linhagens como gB1gB4 e gB2gB3;
4. Esses dados sugerem que há associação entre o genótipo gB2 com maior gravidade na apresentação clínica durante a infecção ativa por HCMV e com a reativação viral após tratamento com ganciclovir; a mistura de linhagens foi o genótipo que apresentou melhor prognóstico da infecção ativa por HCMV.



8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBEROLA J, DOMÍNGUEZ V, CARDEÑOSO L, LÓPEZ-ALDEGUER J, BLANES M, ESTELLÉS F, RICART C, PASTOR A, IGUAL R, NAVARRO D. Antibody Response to Human Cytomegalovirus (HCMV) Glycoprotein B (gB) in AIDS Patients with HCMV End-Organ Disease. *Journal of Medical Virology*, **55**: 272-280, 1998.
- ALBUQUERQUE DM, COSTA SCB. Genotyping of Human Cytomegalovirus using Non-Radioactive Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis. *Journal of Virological Methods*, **110**: 25-28, 2000.
- ALFORD CA, BRITT WJ - Cytomegalovirus in: Fields, B.N. & Knipe, D.M. *Virology* 2 ed., Nova Iorque, **Raven Press: 1981-2010, 1990.**
- ALMEIDA LNB, AZEVEDO RS, AMAKU M, MASSAD E. Cytomegalovirus seroepidemiology in an urban community of São Paulo, Brazil. *Rev Saúde Pública*; **35(2): 124-129, 2001.**
- AQUINO VH, FIGUEIREDO LTM. High prevalence of renal transplant recipients infected with more than one cytomegalovirus glycoprotein B genotype. *Journal of Medical Virology*, **61 (1): 138-142, 2000.**
- AQUINO VH, YAMAMOTO AY, FIGUEIREDO LT.M. Cytomegalovirus (CMV) Glycoprotein B Genotypes Causing Congenital and Perinatal Infections. *Virus - Resumos da VI Viroológica* **97, 2:161, 1997.**
- AUGUSTYNOWICZ E, DZIERZANOWSKA D. Molecular Analysis of the Human Cytomegalovirus Strains Isolated from Infected Infants. *Acta Microbiologica Polonica*, **47(4): 373-383, 1998.**
- BALFOUR HH JR. Management of cytomegalovirus disease with antiviral drugs. *Rev Infect Dis* **12 (Suppl.7): S849-S860, 1990.**
- BINDER T, SIEGERT W, KRUSE A, OETTLE H, WILBORN F, PENG R, TIMM H, NEUHAUS P, SCHMIDT CA. Identification of Human Cytomegalovirus Variants by Analysis of Single Strand Conformation Polymorphism and DNA Sequencing of the Envelope Glycoprotein B Gene Region-Distribution Frequency in Liver Transplant Recipients. *Journal of Virological Methods*, **78(1-2): 153-162, 1999.**
- BOECKH M, BOWDEN RA, GOODRICH, JM, PETTINGER M, MEYERS JD. Cytomegalovirus Antigen Detection in Peripheral Blood Leukocytes After Allogeneic Marrow Transplantation. *Blood* **80(5): 1358-1364, 1992.**

BOECKH M, BOWDEN RA, GOOLEY T, MYERSON D, COREY L. Successful modification of a pp65 antigenemia-based treatment strategy for prevention of CMV disease in allogeneic marrow transplant recipients. *Blood* **93**: 1781-1782, 1999 (letter).

BOECKH M, BOIVIN G. Quantitation of Cytomegalovirus: Methodologic Aspects and Clinical Applications. *Clin Microbiol Rev* **11**(3): 533-554, 1998.

BOECKH M, WOGERD PM, STEVENS-AYERS T, RAY CG, BOWDEN RA. Factors influencing detection of quantitative cytomegalovirus antigenemia. *J Clin Microbiol*, **32**: 832-834, 1994.

BONGARTS A, von LAER D, VOGELBERG C, EBERT K, van LUNZEN J, GARWEG J, VAITH P, HUFERT F, HALLER O, MEYER-KONIG U. Glycoprotein B Genotype of Human Cytomegalovirus: Distribution in HIV -Infected Patients. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, **28**: 447-449, 1996.

BONON SHA, MENONI SMF, ROSSI CL. Surveillance of cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation patients. *Journal of Infectio.*, **50**(2): 130-137, 2004

BRESNAHAN WA, SHENK T. A Subset of Viral Transcripts Packege Within Human Cytomegalovirus Particles. *Science*, **288**: 2373-2376, 2000.

BRITT WJ, MACH M. Human Cytpmegalovirus Glycoproteins. *Intervirolgy*, **39** (5,6): 401-412, 1996

BROWN HL, ABERNATHY MP. Cytomegalovirus Infection. *Seminars in Perinatology*, **22**(4): 260-266, 1998.

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* **32**: 127-138, 1991.

CAMARGO LFA, GRANATO CFH, TOMYIAMA HT, COBO E, AJZEN H, PESTANA JOM. Infecção pelo CMV em pacientes submetidos a transplante renal: Estudo de 20 casos. *Jornal Braileiro. Nefrologia*. **18**(2): 130-136, 1996.

CHEE MA, BANKIER AT, BECK S. An analysis of the protein coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol*, **154**: 125-169, 1990.

CHOU S. Newer Methods for Diagnosis of Cytomegalovirus Infection. *Rev. Infect. Dis.* **12(7)**: 727-735, 1990.

CHOU S. Differentiation of Cytomegalovirus Strains by Restriction Analysis of DNA Sequences Amplified ITom Clinical Specimens. *Journal of Infectious Diseases*, **162**: 738-42, 1990.

CHOU S, DENNISON KM. Analysis of Interstrain Variatiol1 in Cytomegalocirus Glycoprotein B Sequences Encoding Neutralization-Related Epitopes. *Journal of Infectious Diseases*, **163**: 1229-1234, 1991.

CHRISP P, CLISSOLD SP. Foscarnet: a review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunocompromised patients with CMV retinitis. *Drugs* **41**: 104-129, 1991.

COLIMON R, MICHELSON S. Human Cytomegalovirus: pathology, diagnosis, and treatment. *Adv. Nephrol.*: 333-356, 1990.

COSTA SCB. Infecção por Citomegalovírus (CMV): Epidemiologia, Diagnóstico e Tratamento. *Revista Brasileira de Clínica Terapêutica*, **25(1)**: 18-28, 1999.

COSTA SCB, MIRANDA SRP, ALVES G, ROSSI CL, FIGUEIREDO LTM, COSTA FF. Detection of Cytomegalovirus Infections by PCR in Renal Transplant Patients. *Brazilian Journal of Medical an Biological Research*, **32**: 953-959, 1999.

CRUMPACKER CS. Ganciclovir. *N. Engl. J. Med.* **335(10)**: 721-729, 1996.

DARLINGTON J, SUPER M, PATEL K, GRUNDY JE, GRIFFITHS PD, EMERY VC. Use of the Polymerase Chain Reaction to Analyse Sequence Variati°!! within a Major Neutralizing Epitope of Glycoprotein B (gp58) in Clinical Isolates of Human Cytomegalovirus. *Journal of General Virology*, **72**: 1985-1989, 1991.

DE CLERCQ E. Therapeutic potential of HPMPC as an antiviral drug. *Rev Med Virol* **3: 85-96, 1993.**

DEMMLER GJ, BUFFONE GJ, SCHIMBOR CM, MAY RA. Detection of Cytomegalovirus in Urine from Newborns by Using Polymerase Chain Reaction DNA Amplification. *J. Infect. Dis.* **158: 1177-1184, 1988.**

DRAGO F, ARAGONE MG, LUGANI C, REBORA A. Cytomegalovirus Infection in Normal and Immunocompromised Humans. *Dermatology*, **200: 189-195, 2000.**

DREW WL. Diagnosis of Cytomegalovirus Infection. *Reviews of Infectious Diseases*, **10 (suppl3): 468-476, 1988**

DREW WL. Herpesviridae: Cytomegalovirus. *Laboratory Diagnosis Infectious Diseases (Principles and Practice)*, vol II, **247-260, 1988.**

EINSELE H, EHNINGER G, HEBART H, *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* **86(7): 2815-2820, 1995.**

EPPE RE, PITTELKOW MR, SU DWP: TORCH syndrome. *Semin Dermatol*; **14: 179-186, 1995.**

ERICE A. Resistance of Human Cytomegalovirus to Antiviral Drugs. *Clinical Microbiology Reviews*; **12(2): 286-297, 1999.**

ERICE A, HOLM MA, SANJUAN MV, DUNN DL, GILL PC, BALFOUR JR HH. Evaluation of CMV-vue antigenemia assay for rapid detection of cytomegalovirus in mixed-leukocyte blood fractions. *J. Clin Microbiol* **33: 1014-1015, 1995.**

FRIES BC, CHOU S, BOECKH M, TOROK-STORB B. Frequency Distribution of Cytomegalovirus Envelope Glycoprotein Genotypes in Bone Marrow Transplant Recipients. *Journal of Infectious Diseases*, **169: 769-774, 1994.**

GERNA G, ZIPETO E, PERCIVALLE E, PÁREA M, REVELLO MG, MACCARIO R, PERI G, MILANESI G. Human cytomegalovirus infection of the major leukocyte subpopulations and evidence for initial viral replication in polymorphonuclear Leukocytes from viremic patients. *J. Infect. Dis.*, **166: 1236-1244, 1992.**

GILBERT C, HANDFIELD J, TOMA E, LALONDE R, BERGERON MG, BOIVIN G. Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotypes in Blood of AIDS Patients: Lack Association with either the Viral DNA Load in Leukocytes or Presence of Retinitis. *Journal of Medical Virology*, **59(1): 98-103, 1999.**

GONDO H, MINEMATSU T, HARADA M, *et al.* Cytomegalovirus (CMV) antigenaemia for a rapid diagnosis and monitoring of CMV-associated disease after bone marrow transplantation. *Br J Haematol*; **86 (1): 130-137, 1994.**

GOODRICH JM. Cytomegalovirus. *eMedicine Journal*, September 10; **vol 2, n.9, 2001.**

GRIFFITHS PD, PANJWANI DD, STIRK PR, GANCZAKOWSKI M, BALL MG, BLACKLOCK HA, PRENTICE HG. Rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients by detection of early antigen fluorescent foci. *Lancet*; **ii: 1242-1244, 1984.**

GRUNDY JE. Virologic and pathogenetic aspects of cytomegalovirus infection. *Rev Infect Dis*; **12(Suppl 7): 711-719, 1990.**

GUGLIELMO BJ, WONG-BERINGER A, LINKER CA. Immunoglobulin therapy in allogeneic bone marrow transplant: a critical review. *Bone Marrow Transplantation* ; **13: 499-510, 1994.**

HAASTRUP E, MÜLLER K, BAEKGAARD H, HEILMANN C. Cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplant in children. *Pediatric transplantation*. **9: 734-740, 2005.**

HARDY AM, ALLEN JR, MORGAN WM, CURRAN JW. The incidence rate of acquired immunodeficiency syndrome in selected populations. *JAMA* **253: 215-220, 1985.**

HEBART H, GREIF M, KRAUSE H, KANZ L, JAHN G, MÜLLER CA, EINSELE H, Interstrain Variation of Immediate Early DNA Sequences and Glycoprotein B Genotypes in Cytomegalovirus Clinical Isolates. *Medical Microbiology and Immunology*, **186: 135-138, 1997.**

HO M. Cytomegalovirus: Biology and Infection, 2.ed. New York, **Plenum Publishing Corporation: 1-440, 1991.**

HODINKA RL, FRIEDMAN HM. Human cytomegalovirus. In Ballows A, Hausler Jr WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ; eds. **Manual of Clinical Microbiology**, 5th ed., American Society for Microbiology, Washington D.C., **pp.829-837, 1991.**

HUANG ES, HUONG SM, TEGMEIER GE, ALFORD CA JR. Cytomegalovirus: Genetic Variation of viral Genomes. *Ann N Y Acad Sci.* **354: 332-346, 1980.**

JIWA NM, VAN DER RIJKE FM, MULDER A, VAN DER BIJ W, THE TH, ROTHBARTH PHH, VELZING J, VAN DER PLOEG M, RAAP AK. An improved immunocytochemical method for the detection of human cytomegalovirus antigens in peripheral blood leukocytes. **Histochemistry 91: 345-349, 1989.**

JIWA NM, VAN GEMERT GW, RAAP AK, VAN DER RIJKE FM, MULDER A, LENS PF, SALIMANS MMM, ZWAAN FE, VAN DORP W, VAN DER PLOEG M. Rapid detection of human cytomegalovirus DNA in Peripheral Blood Leukocytes of Viremic Transplant Recipients by the Polymerase Chain Reaction. **Transplantation, 48: 72-76, 1989.**

LANDOLFO S, GARIGLIO M, GRIBAUDO G, LEMBO D. The Human Cytomegalovirus. *Pharmacology & Therapeutics*, **98: 269-297, 2003**

LASRY S, DÉNY P, ASSELO C, RAUZY M, BOUCHER J, GUYOT C, LEROUX MC, WARTOWSKI A, REINERT P, NICOLAS JC. Interstrain Variations in the Cytomegalovirus (CMV) Glycoprotein B Gene Sequence among CMV-Infected Children Attending Six Day Care Centers. **Journal of Infectious Diseases, 174: 606-609, 1996.**

LEHNER R, STAMMINGER T, MACH M. Comparative Sequence Analysis of Human Cytomegalovirus Strains. **Journal of Clinical Microbiology, 29: 2494-2502, 1991.**

LESHER JL. Cytomegalovirus infections and the skin. **J Am Acad Dermatol 18: 1333-1338, 1988.**

LJUNGMAN e EINSELE. Cytomegalovirus infection. *Curr Opin Hematol.* Nov;1(6):418-22. Review, 1994.

LJUNGMAN P. Prevention and treatment of viral infections in stem cell transplant recipients. *Br J Haematol* 118: 44-57, 2002.

LJUNGMAN P e PLOTKIN SA. Workshop on CMV Disease: Definitions, Clinical Severity Scores, and New Syndromes. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 99: 87-89, 1995.

LJUNGMAN P, LAMBERTENGHI D, PLATZBECKER U, *et al.* Cidofovir for CMV infection and disease in allogeneic stem cell transplant recipients. *Blood*; 97: 388, 2001.

LO CY, KY YUEN, SL LUI, FKLI, T.M CHAN, WKLO AND IK CHENG. Diagnosing cytomegalovirus disease in CMV seropositive renal allograft recipients: a comparison between the detection of CMV DNAemia by polymerase chain reaction and antigenemia by CMV pp65 assay. *Clin Transplant.* 11: 286-293, 1997.

MACHADO CM, DULLEY FL, VILAS BOAS LS, CASTELLI JB, MACEDO MCA, SILVA RL, PALLOTA R, SABOYA RS AND PANNUTTI CS. CMV pneumonia in allogeneic BMT recipients undergoing early treatment or pre-emptive ganciclovir therapy. *Bone Marrow Transplantation* 26: 413-417, 2000.

MAR EC, CHIOU JF, CHENG YC, HUANG ES. Inhibition of cellular DNA polymerase- α and human cytomegalovirus-induced DNA polymerase by the triphosphates of 9-(2-hydroxyethoxy-methyl) guanine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine. *J Med Virol* 53: 776-780, 1985.

MAYA TC, AZULAY DR. Infecção pelo Citomegalovírus. In: LUPI, O.; SILVA, A.S.; PEREIRA Jr., A.C. - *Herpes - Clínica, Diagnóstico e Tratamento*, 10 edição, Medsi Editora Médica e Científica Ltda, 2000. Cap 8, p. 135-156.

MCKEATING JA, STAGNO S, STIRK PR, GRIFITHS PD. Detection of Cytomegalovirus in Urine by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Med. Virol.* 16: 367-373, 1985.

MIR S, ERDOĞAN H, KABASAKAL C, HOSKOSKUN C. Pediatric renal transplantation: Single center experience. *Pediatric transplantation.* 9: 56-61, 2005

MYERS JB, D AMSTERDAM. The laboratory diagnosis of cytomegalovirus infections. *Immunol. Invest.* **26(3)**, 383-394, 1997.

MYER-KONIG D, HABERLAND M, von LAER D, HALLER O, HUFERT FT. Intragenic Variability of Human Cytomegalovirus Glycoprotein B in Clinical Strains. *Journal of Infectious Diseases*, **177**: 1162-1169, 1998(2).

MEYER-KONIG D, VOGELBERG C, BONGARTS A, KAMP AD, DELBRÜCK R, WOLFFVORBECK G, KIRSTE G, HABERLAND M, HUFERT FT, von LAER D. Glycoprotein B Genotype Correlates with Cell Tropism *In Vivo* of Human Cytomegalovirus Infection. *Journal of Medical Virology*, **55**: 75-81, 1998.

MOCARSKI ES Jr, ABENES GB, MANNIG WC, SAMBUCETTI LC, CHERRINGTON JM. Molecular Genetic Analysis of Cytomegalovirus Gene Regulation in Growth, Persistence and Latency. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **154**: 47-73, 1990.

MURRAY BM. Management of Cytomegalovirus Infection In Solid-Organ Transplant Recipients. *Immunological Investigations* **26**: 243-255, 1997.

MUSTAFA MM. Cytomegalovirus infection and disease in the immunocompromised host. *Ped. Infect. Dis. J.* **13**: 249-59, 1994.

NAVARRO D, LENNETTE E, TUGIZOV S, PEREIRA L. - Humoral Immune Response to Functional Regions of Human Cytomegalovirus Glycoprotein B. *Journal of Medical Virology*, **52**: 451-459, 1997.

NICHOLS WG, BOECKH M. Recent advances in the therapy and prevention of CMV infections. *Journal of Clinical Virology*, **16**: 25-40, 2000.

NIUBÓ J, PEREZ JL, MARTINEZ-LACASA JT, GARCIA A, ROCA J, FABREGAT J, GIL-VERNET S AND MARTIN R. Association between quantitative cytomegalovirus antigenemia with symptomatic infection in solid organ transplant patients. *Diagn. Microbiol. Infec. Dis.* **24**: 19-24, 1996.

OLIVE DM, SIMSEK M, AL-MUFTI S. Polymerase chain reaction assay for detection of human cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.* **27: 1238-1242, 1989.**

PALACIO A, DURAN-VILA N. Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis as a Tool for Viroid Characterisation. *Journal of Virological Methods*, **77: 27-36, 1999.**

PANNUTI CS, KALLÁS EG, MUCCIOLI C, ROLAND RK, FERREIRA EC, BUENO MHS, DO CANTO CLM, VILAS BOAS LS AND BELFORT R. Cytomegalovirus Antigenemia in Acquired Immunodeficiency Syndrome Patients With Untreated Cytomegalovirus Retinitis. *Am J of Ophthalmology* **122: 847-852, 1996.**

PANNUTI CS, VILAS BOAS LS, AMATO NETO V, *et al.* Detecção de anticorpos IgM nas infecções primárias e secundárias pelo citomegalovírus em pacientes submetidos a transplante renal. *Rev Inst Med Trop São Paulo* **1987; 29: 317-22.**

PANNUTTI CS. Citomegalia. In: Ferreira, A. W.; Ávila, S.L.M. eds. Diagnóstico Laboratorial das principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes, 2^a. edição, Editora Guanabara Koogan, **Cap. 5, p. 68-73, 2001.**

PANNUTTI CS. Infecção por CMV. Revisão e Ensaios. *Pediat (S.Paulo)*, **6: 144-153, 1984.**

PLACHTER B, SINZGER C, JAHN G. Cell Types Involved in Replication and Distribution of Human Cytomegalovirus. *Advances in Virus Research*, **46: 195-261, 1996.**

PREISER W, BRÄUNINGER S, SCHWERDTFEGER R, AYLIFFE U, GARSON JA, BRINK NS, FRANCK S, DOERR HW, RABENAU HF. Evaluation of diagnostic methods for the detection of cytomegalovirus in recipients of allogeneic stem cell transplants. *Journal of Clinical Virology* **20, 59-70, 2001.**

RASMUSSEN L, HONG C, ZIPETO D, MORRIS S, SHERMAN D, CHOU S, MINER R, DREW WL, WOLITZ R, DOWLING A, WARFORD A, MERIGAN TC. Cytomegalovirus gB Genotype Distribution Differs in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients and Immunocompromised Allograft Recipients. *Journal of Infectious Diseases*, **175: 179-184, 1997.**

RASMUSSEN L, MATKIN C, SPAETE R, PACHL C, MERIGAN TC. Antibody Response to Human Cytomegalovirus Glycoprotein gB e gH after Natural Infection in Humans. *Journal of Infectious Diseases*, **164**: 835-842, 1991.

RAWLINSON WD. Diagnosis of Human Cytomegalovirus Infection and Disease. *Pathology* **31**, p. 109-115, 1999.

Recommendations of CDC, the Infectious Diseases Society of America, and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients. *Biol Blood Marrow Transplant*; **6**: 659, 2000.

RETIERE C, IMBERT BM, DA VID G, COURCOUX P, HALLET MM. A Polymorphism in the Major Immediate-Early Gene Delineates Groups Among Cytomegalovirus Clinical Isolates. *Virus Research*, **57**: 43:51, 1998.

REUSSER P. Challenges and options in the management of viral infections after stem cell transplantation. *Support Care Cancer* **10**: 197-203, 2002.

ROBERTS TC, BULLER RS, GAUDREAULT-KEENER M, STERNHELL KE, GARLOCK K, SINGER GG, BRENNAN DC AND STORCH G. Effects of Storage Temperature and time on qualitative and Quantitative Detection of Cytomegalovirus in Blood Specimens by Shell Vial Culture and PCR. *J Clin Microbiol*, **35** (9), p.2224-2228, 1997.

ROIZMAN B. Redefining Virology. *Science*, **288**(5475): 2373-2376, 2000.

ROSEN HR, CORLESS CL, RABKIN JM, CHOU S. Association of Cytomegalovirus Genotype with Graft Rejection after Liver Transplantation. *Transplantation*, **66**: 1627-1631, 1998.

RUBIN RH. Impact of cytomegalovirus infection on organ transplant recipients. *Rev Infec Dis* **12**(suppl 7): 754-766, 1990.

RUBIN RH. Infectious disease complication in renal transplantation. *Kidney Int.* **44: 221-236, 1993.**

RUBIN RH Preemptive therapy in immunocompromised hosts. *N. Engl. J. Med.* **324: 1057-1059, 1991.**

SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, ERLICH HA. Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* **230: 1350-1354, 1985.**

SALZBERGER B, BOWDEN RA, HACKMAN RC, DAVIS C, BOECKH M. Neutropenia in allogeneic marrow transplant recipients receiving ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease: risk factors and outcome. *Blood*, **90 (6): 2502-8, 1997**

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATS T. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual. (ed2). Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.**

SHEPP DH, MATCH ME, ASHRAF AB, LIPSON SM, MILLAN C, PERGOLIZZI RG. Cytomegalovirus Glycoprotein B Groups Associated with Retinitis in AIDS. *Journal of Infectious Diseases*, **174: 184-187, 1996.**

SHEPP DH, MATCH ME, LIPSON SM, PERGOLIZZI RG. A Fifth Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotype. *Research in Virology*, **149: 109-114, 1998.**

SHEEP DH, DANDLIKER PS, MIRANDA P, *et al.* Activity of 9-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethoxymethyl] guanine in the treatment of cytomegalovirus pneumonia. *Ann Intern Med* **103: 368-373, 1985.**

SHIBATA D, MARTIN WJ, APPLEMAN MD, CAUSEY DM, LEEDOM JM, ARNHEIM N. Detection of Cytomegalovirus DNA in Peripheral Blood of Patients Infected with Human Deficiency Virus. *J Infect Dis* **158: 1185-1192, 1988.**

SIA IG & PATEL R. New Strategies for Prevention and Therapy of Cytomegalovirus Infection and Disease in Solid-Organ Transplant Recipients. *Clinical Microbiology Reviews*, **13: 83-121, 2000.**

SILVA AG. Propriedades Gerais dos Herpesvírus. In: LUPI, O.; SILVA, A.S.; PEREIRA Jr., A.C. *Herpes - Clínica, Diagnóstico e Tratamento*, 10 edição, **Medsi Editora Médica e Científica Ltda, 2000. Capo 8, p:135-156.**

SMITH MG. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol Med*, **92: 418-424, 1956.**

SOLANO S, MUÑOZ I, GUTIÉRREZ A, FARGA A, PRÓSPER F, GARCÍA-CONDE J, NAVARRO D, GIMENO C. Qualitative Plasma PCR Assay (AMPLICOR CMV Test) versus pp65 Antigenemia Assay for Monitoring Cytomegalovirus Viremia and Guiding Preemptive Ganciclovir Therapy in Allogeneic Stem Cell Transplantation. *J Clin Microbiol* **39 (11): 3938-3941, 2001.**

SOUZA LE, NICHOLSON D, MATTHEY S, ALDEN R, HAUGEN TH, TRIGG ME, BALE JE. Rapid Epidemiologic Characterization of Cytomegalovirus Strains in Pediatric Bone Marrow Transplant Patients. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, **16: 399-404, 1995)**

STINSKI MF. Cytomegalovirus and its replication. In: Fields, BN; Knipe, DM – **Virology**, **2 ed.**, New York, Raven Press Ltda, p. 1959-1980, **1990.**

STRAUS SE. Introduction to *herpesviridae*. In: Mandel, G.L.; Douglas Jr, R.G.;10 Bennett, J.E. **Principles and Practice of Infectious Diseases**, 3ed., New York, Churchill Livingstone: 1139-1144, **1990.**

SUASSUNA JHR, MACHADO RD. Diagnóstico das Infecções por Citomegalovírus (CMV) em Pacientes com Deficiência Imunológica. *Revista da Associação de Medicina do Brasil*, **38(1): 33-47, 1992.**

SWEET C AND SMITH H. The pathogenicity of viruses. In: **Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity**, 8th edn., Vol.4 (Collier, L.S. and Timbury, M.C., Eds.), pp. 105-130. Edward Arnold, London, UK, **1990.**

SWEET C. The pathogenicity of cytomegalovirus. *FEMS Microbiology Reviews* **23: 457-482, 1999.**

TEGTMEIER GE. Posttransfusion cytomegalovirus infections. *Arch Pathol Lab Med*; **113: 236-245, 1989.**

THE TH, VAN DEN BERG AP, HARMSSEN MC, VAN DER BIJ W, VAN SON WJ. The cytomegalovirus antigenemia assay: a plea for standardization. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **99: 25-29, 1995.**

THE T.H, VAN DER BIJ W, VAN DER BERG AP, VAN DER GIESSEN M, WEITS J, SPRENGER HG, VANSON WJ. Cytomegalovirus Antigenemia. *Rev. Infect. Dis.* **12(7): 737-744, 1990.**

THE TH, VAN DER PLOEG M, VAN DER BERG AP, VLIEGER AM, VAN DER GIESSEN M, VAN SON WJ. Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes: a review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. *Transplantation* **54(2): 193-198, 1992.**

TOROK-STORB B, BOECKH M, HOY C, LEISENRING W, MYERSON D, GOOLEY T. Association of Specific Cytomegalovirus Genotypes with Death ITom Myelosuppression after Marrow Transplantation. *Blood*, **90(5): 2097-2102, 1997.**

TRINCADO DE, SCOTT GM, WHITE PA, HUNT C, RASMUSSEN L, RA WLINSON WD. Human Cytomegalovirus Strains Associated with Congenital and Perinatal Infections. *Journal of Medical Virology*, **61(4): 481-487, 2000.**

VAN DEN BERG AP, KLOMPMAKER IJ, HAAGSMA EB, SCOLTEN-SAMPSON A, BIJLEVEL CMA, SCHIRM J, VAN DER GIESSEN M, SLOOFF MJH, THE TH. Antigenemia in the Diagnosis and Monitoring of Active Cytomegalovirus Infection after Liver Transplantation. *J Infect Dis* **164: 265-270, 1991.**

VAN DER BIJ W, SCHIRM J, TORENSMA R J, VAN SON W, TEGZESS AM AND HAUW THE T. Comparison between Viremia and Antigenemia for Detection of Cytomegalovirus in Blood. *J Clin Microbiology* **26 (12): 2531-2535, 1988a.**

VAN DER BIJ W, TORENSMA R, VAN SON WJ, TEGZESS AM, THE TH. Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leukocytes. *J. Med. Virol.* **25, 179-188, 1988b.**

VAN DER MEER JTM, DREW WL, BOWDEN RA, GALASSO GJ, GRIFFITHS PD, JABS DA, KATLAMA C, SPECTOR AS, WHITLEY RJ. Summary of the International Consensus Symposium on Advances in the Diagnosis, Treatment and prophylaxis of Cytomegalovirus Infection. *Antiviral Research* **32: 119-140, 1996.**

VERHEYDEN JPH. Evolution of therapy for cytomegalovirus infection. *Rev. Infect. Dis.* **10 (suppl. 3), S477-S489, 1988.**

VERONESI R, DM DC. Citomegalia. **Doenças Infecciosas e Parasitárias, 8 ed.: 206-211, 1991.**

VILMER C, PÉROL Y. Manifestations cutanées des infections à cytomegalovirus. *Ann Dermatol Vénéréol*; **111: 119-125, 1984.**

VOGELBERG C, MEYER-KONIG U, HUFERT FT, KIRSTE G, von LAER D. Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotypes in Renal Transplant Recipients. *Journal of Medical Virology*, **50: 31-34, 1996.**

WADA K, MIZUNO S, KATO K, KAMIYA T, OZAWA K. Cytomegalovirus Glycoprotein B Sequence Variation among Japanese Bone Marrow Transplant Recipients. *Intervirology*, **40: 215-219, 1997.**

WELLER TH, HANSHAW JE. Virologic and Clinical Observations on Cytomegalic Inclusion Disease. *New England Journal of Medicine*, **226: 1233-1244, 1962.**

WELLER TH. The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations (First of two parts). *N. Engl. J. Med.* **285: 203-214, 1971.**

WELLER TH. The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations (Second of two parts). *N. Engl. J. Med.* **285: 267-274, 1971.**

WINGART RZ, BRYTTING M, LINDE A, WAHREN R, GRILLNER L. Sequence Variation within Three Important Cytomegalovirus Gene Regions in Isolates from Four Different Patient Populations. *Journal of Clinical Microbiology*, **36(12): 3662-3669, 1998.**

WINSTON DJ, HO G, BARTONI RN, MOND C, EBELING DF, BUHLES WC, CHAMPLIN RE Ganciclovir prophylaxis of cytomegalovirus infection and disease in .allogeneic bone marrow transplant recipients: results of a placebo-controlled, double-blind trial. *Ann. Int. Med.* 118: 179-184, 1993.

ZAIA JÁ. Cytomegalovirus Infections. In: Thomas, E.D.; Blume, K.G.; Forman, S.J. **Hematopoietic Cell Transplantation. Seconde Edition: Blackwell Science; 1999. chapter 51, p. 560-583.**



9- ANEXOS

ANEXO I -TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____

RG: _____, responsável por _____

_____, autorizo sua colaboração com o estudo **“DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE CITOMEGALOVÍRUS EM RECEPTORES PEDIÁTRICOS DE TRANSPLANTE RENAL, HEPÁTICO E DE MEDULA ÓSSEA”** que será realizado na faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para pesquisa da infecção ativa pelo Citomegalovirus utilizaremos técnicas rápidas e precoces: Antigenemia e Nested-PCR e para identificação da linhagem viral serão realizadas técnicas de análises enzimática de restrição em amostras positivas detectadas por Antigenemia e Nested PCR. Para isso, sei que colherão amostras de sangue (4ml em tubo contendo como anticoagulante EDTA), uma vez por semana, sendo coletada no mesmo dia dos exames de rotina pós-transplante, desde o dia do transplante até 150 dias após o transplante, para realização dos referidos exames. Este material será apenas utilizado para este estudo, sendo posteriormente descartado. Estou ciente de que poderei desistir da participação deste estudo a qualquer hora, e que isto nada irá prejudicar o tratamento, e essa colaboração em muito auxiliará o tratamento dos pacientes transplantados e os que vierem também a serem transplantados e que não receberei ressarcimento financeiro, pois estes exames são de rotina pós-transplante. Estou ciente que todos os dados colhidos através de informações clínicas obtidas de prontuários médicos serão sigilosos, e que o nome do colaborador não será colocado em qualquer publicação.

Campinas, _____ de _____ de _____

Assinatura do Responsável

Pesquisador responsável: Débora de Campos Dieamant – tel. (19) 3441-1688
ou 9607-0313

E-mail: ddieamant@vivax.com.br

Orientador (a): Prof^ª Dr^a Sandra Cecília Botelho Costa – tel (19) 3289-2351

E-mail: costa@fcm.unicamp.br

Comitê de Ética em Pesquisa – tel (19) 3788-8936

ANEXO II

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-8925

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

📧 cep@fcm.unicamp.br

CEP, 02/05/06.

(Grupo III)

PARECER PROJETO: Nº 001/2005

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE CITOMAGALOVIRUS EM RECEPTORES PEDIÁTRICOS DE TRANSPLANTE RENAL, HEPÁTICO E DE MEDULA ÓSSEA”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Débora de Campos Dieamant

INSTITUIÇÃO: Hospital de Clínicas da Unicamp e Centro Infantil Boldrini.

APRESENTAÇÃO AO CEP: 05/01/2005

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/05/06

II - OBJETIVOS

Estimar a prevalência de CMV em pacientes pediátricos transplantados e estabelecer a genotipagem dos vírus encontrados.

III - SUMÁRIO

Pesquisa da ocorrência do CMV em 30 pacientes transplantados, com técnicas de genotipagem de biologia molecular e imunologia.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Com base nos dados de literatura mencionados pelos pesquisadores, a amostra dimensionada é suficiente, em princípio, para atingir-se o objetivo do trabalho. Não há riscos aos pacientes e os resultados obtidos terão retorno imediato aos sujeitos da pesquisa, independentemente do resultado final do trabalho.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o 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.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

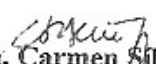
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de maio de 2005.


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



ANEXO III -FICHA DE ACOMPANHAMENTO

TRANSPLANTE RENAL PEDIÁTRICO

DATA ____/____/____

NOME DO PACIENTE : _____

HC: _____ SEXO: _____ COR: _____

DATA NASC.: ____/____/____

DIAGNÓSTICO PARA Tx: _____

DATA DO TRANSPLANTE: ____/____/____ INTERNAÇÃO ☐ Não ☐ Sim

Data : _____ Alta: _____ DOADOR: ☐

CADÁVER / CAUSA DO ÓBITO: _____

☐ VIVO / PARENTESCO : _____ IDADE: _____

ANTECEDENTES PRÉ-TRANSPLANTE

Politransusão ☐ Sim _____ ☐ Não _____

Imunossupressão _____



Sorologia

POSITIVO

NEGATIVO

Hepatite C

☐☐

Hepatite B

☐☐

HIV

☐☐

Toxoplasmose

☐☐

Moradia

☐ Urbana ☐ Rural / Animal Doméstico: ☐ Sim _____ ☐ Não

Diálise : ☐ Não ☐ Sim → Tipo : _____ Tempo : _____

PRÉ –TRANSPLANTE

RECEPTOR	DOADOR
IgM-	IgM-
IgG-	IgG-
PCR-	PCR-
ANTIGENEMIA-	ANTIGENEMIA-
DATA DA COLETA:	DATA DA COLETA:

PÓS – TRANSPLANTE

QUADRO CLÍNICO : _____

SUSPEITA DE CMV → Data: _____

Sintomas: _____

Exame físico (fundo de olho): _____

Data da Confirmação e início do tratamento: _____

DIAGNÓSTICO ATRAVÉS DE :

Sorologia	
Antigenemia	
PCR	

TRATAMENTO : Medicação _____ Dose : _____

Tempo de tratamento : ☐ Internado _____

☐ Ambulatorial _____

INTERCORRENTES DURANTE O TRATAMENTO :



Rejeição ☐ Não

☐ Sim / Tratamento _____

Efeitos Colaterais : ☐ Não

☐ Sim _____

Outros : _____

EVOLUÇÃO DO TRATAMENTO : ☐ Cura _____

☐ Óbito _____

SITUAÇÃO ATUAL DO PACIENTE :

☐ Óbito _____

☐ Vivo → ☐ Com transplante funcional _____

☐ Sem transplante funcional _____

DIA PÓS Tx										
IgM										
IgG										
Biópsia										
Plaquetas										
Netrófilos										
TGO										
TGP										
Creatinina										
pré tratamento										
pós tratamento										

ANEXO IV - TRANSPLANTE PEDIÁTRICO DE MEDULA ÓSSEA

**MONITORIZAÇÃO LABORATORIAL DE INFECÇÃO ATIVA PELO
CITOMEGALOVÍRUS**

RECEPTOR:	
HC: _____	NASC. _____ IDADE: _____ NATURAL. _____ COR: _____
IgG/CMV(pré-tx):	
DIAGNÓSTICO: _____	
TIPO DE ENXERTO: () MO CTP ()	
DOADOR:	
HC: _____	IgG/CMV(pré-tx): _____
DATA DO ÓBITO: ____/____/____ CAUSA DO ÓBITO: _____	
NECRO? S/N ____ AGENTE ETIOLÓGICO: _____	
DATA DO TRANSPLANTE: _____	PEGA: DIA+ _____
CLÍNICA GVHD: _____	
PELE () FÍGADO () TGI () ESTADIO GVHD I() II() III() IV()	
CLÍNICA CMV: _____	
GANCICLOVIR: () PROFILÁTICO – INÍCIO DIA () TRATAMENTO INFECÇÃO – INÍCIO DIA + _____	
() TRATAMENTO DOENÇA – INÍCIO DIA + _____ MANUTENÇÃO S/N ()	
CONDICIONAMENTO: _____	PROFILAXIA GVHD: _____
BIÓPSIA: _____	
CONSENTIMENTO: ()	

Coleta	Dia pós-tx	PCR/CMV	ANTIGENEMIA/CMV	IgG/IgM

OBS.EXAMES REALIZADOS: